
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CAMILA FERREIRA RONCARI

MECANISMOS PROSENCEFÁLICOS ENVOLVIDOS NA
INGESTÃO DE SÓDIO E ÁGUA INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO
GABAÉRGICA DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL

ARARAQUARA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CAMILA FERREIRA RONCARI

MECANISMOS PROSENCEFÁLICOS ENVOLVIDOS NA
INGESTÃO DE SÓDIO E ÁGUA INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO
GABAÉRGICA DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia.

Orientador: José Vanderlei Menani

ARARAQUARA

2010

Roncari, Camila Ferreira

Mecanismos prosencefálicos envolvidos na ingestão de sódio e água induzida pela ativação gabaérgica do núcleo parabrinqial lateral / Camila Ferreira Roncari.– Araraquara: [s.n.], 2010.

72 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. José Vanderlei Menani

1. Muscimol 2. Angiotensina II 3. Acetilcolina 4. Órgão subfornical I. Título

CAMILA FERREIRA RONCARI

**MECANISMOS PROSENCEFÁLICOS ENVOLVIDOS NA INGESTÃO
DE SÓDIO E ÁGUA INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO GABAÉRGICA DO
NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei Menani

2º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Colombari

3º Examinador: Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira

Araraquara, 29 de junho de 2010.

DADOS CURRICULARES

CAMILA FERREIRA RONCARI

NASCIMENTO	01.08.1985 – Franca/SP
FILIAÇÃO	José Donizete Roncari Edna Maria Ferreira Roncari
2003/2007	Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.
2008/2010	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCAR/UNESP).

AOS MEUS PAIS,

JOSÉ E EDNA

AOS MEUS IRMÃOS,

ANA FLÁVIA, DANILO E RENATA

Obrigada pelo amor incondicional e compreensão.

Agradecimentos

Aos meus pais, José e Edna, pelo amor, carinho e apoio, pelos ensinamentos ao longo de toda a vida e pela oportunidade de aprimorar os conhecimentos intelectuais. Aos meus irmãos, Ana Flávia, Danilo e Renata, a vocês, agradeço pelo amor, carinho, apoio e pela compreensão de que o tempo que passamos longe não foi em vão. Ao Richard, pelo amor, companheirismo, paciência e ajuda nos momentos mais difíceis.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani, pela orientação desde a iniciação científica, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de ingresso neste programa de pós-graduação e por todo o conhecimento transmitido nestes seis anos de convivência.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, expresse meu respeito e gratidão.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara pela amizade e pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela amizade e companheirismo.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq por tornarem possível a realização deste trabalho. Especialmente agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa.

A todos, expresse minha mais profunda gratidão.

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luiz Fernando Veríssimo

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVO	27
3 MATERIAL E MÉTODO	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Cirurgia cerebral	28
3.3 Injeção de drogas no encéfalo.....	29
3.4 Drogas utilizadas.....	29
3.5 Ingestão de NaCl 0,3 M e água.....	30
3.6 Ingestão de sacarose 2% e água.....	30
3.7 Análise histológica.....	31
3.8 Análise estatística	31
3.9 Protocolos experimentais.....	31
3.9.1 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de losartan.	31
3.9.2 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. combinada de losartan e atropina.....	32
3.9.3 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção de losartan ou atropina no OSF.....	32
3.9.4 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.....	33
3.9.5 Ingestão de sacarose 2% e água em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.....	33
4 RESULTADO	34
4.1 Análise histológica.....	34

4.2 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de losartan.....	37
4.3 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. combinada de losartan e atropina.	39
4.4 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção de losartan ou atropina no OSF.	41
4.5 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção de losartan ou atropina fora do OSF.....	43
4.6 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.	46
4.7 Ingestão de sacarose 2% e água em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.	48
4.8 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL após diferentes pré-tratamentos.....	50
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO.....	65
7 REFERÊNCIAS*	66

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no OSF (indicado pela seta). Barra preta = 1000 μm 35
- FIGURA 2** – Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas) e pedúnculo cerebelar superior (pcs; destacados pelos círculos pontilhados vermelhos). Barra preta = 1000 μm 36
- FIGURA 3** – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) ou salina no NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan (50 μg /1,0 μl e 100 μg /1,0 μl) ou veículo (solução salina tamponada). Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais..... 38
- FIGURA 4** – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) ou salina no NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan (100 μg /1,0 μl) e/ou atropina (20 nmol/1,0 μl) ou veículo (solução salina tamponada). Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais. 40
- FIGURA 5** – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) ou salina no NPBL combinado com injeção de losartan (1 μg /0,1 μl), atropina (2 nmol/0,1 μl) ou veículo (solução salina tamponada) no OSF. Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais. 42
- FIGURA 6** – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) ou salina no NPBL combinado com injeção i.c.v. de moxonidina (20 nmol/1,0 μl) ou veículo (propilenoglicol e água 2:1). Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais..... 47
-
-

FIGURA 7 – Ingestão cumulativa de (A) sacarose 2% e (B) água após injeção i.c.v. de moxonidina (20 nmol/1,0 µl) ou veículo (propilenoglicol e água 2:1). Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais.49

FIGURA 8 – Diagrama esquemático mostrando possíveis mecanismos facilitatórios e inibitórios e áreas encefálicas envolvidas no controle da sede e apetite ao sódio. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; CCK, colecistocinina; CeA, núcleo central da amígdala; Glu, glutamato; NPBL, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical..... 63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinado com injeção de losartan, atropina ou veículo no III-V.44
- Tabela 2** – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinado com injeção de losartan, atropina ou veículo no tecido adjacente ao OSF.....45
- Tabela 3** – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan ou veículo.....51
- Tabela 4** – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan, atropina ou veículo.52
- Tabela 5** – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinado com injeção de losartan, atropina ou veículo no OSF.53
-
-

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG I – angiotensina I

ANG II – angiotensina II

ANP – peptídeo natriurético atrial

AP – área postrema

AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo

CCK – colecistocinina

CeA – núcleo central da amígdala

d.i. – diâmetro interno

DNQX – 6,7-dinitro-quinoxalina-2,3-diona

DOCA – desoxicorticosterona

DOI – 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina

E.P.M. – erro padrão da média

ECA – enzima conversora de angiotensina

g – grama(s)

GABA – ácido γ -aminobutírico

Glu – glutamato

h – hora(s)

HSD2 – 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2

i.c.v. – intracerebroventricular

III-V – terceiro ventrículo

kg – quilograma

M – molar

mg – miligrama(s)

min – minuto(s)

ml – mililitro(s)

mm – milímetro(s)

MnPO – núcleo pré-óptico mediano

NaCl – cloreto de sódio

nmol – nanomol(es)

NPBL – núcleo parabraquial lateral

NTS – núcleo do trato solitário

NTSm – núcleo do trato solitário medial

OSF – órgão subfornical

OT – ocitocina

OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal

pcs – pedúnculo cerebelar superior

s.c. – subcutânea

VL – ventrículo lateral

% – por cento

α – alfa

B – beta

< – menor

> – maior

\pm – mais ou menos

μ g – micrograma(s)

μ l – microlitro(s)

μ m – micrometro(s)

5-HT – serotonina

Roncari CF. Mecanismos prosencefálicos envolvidos na ingestão de sódio e água induzida pela ativação gabaérgica do núcleo parabraquial lateral [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 2010.

RESUMO

Estudos recentes mostraram a existência de importantes mecanismos de controle da ingestão de sódio e água no núcleo parabraquial lateral (NPBL), uma estrutura pontina localizada dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior. Lesões eletrolíticas ou neurotóxicas do NPBL aumentam a ingestão de água induzida por administração central ou periférica de angiotensina II (ANG II). O bloqueio dos receptores serotoninérgicos, colecistocinérgicos ou glutamatérgicos com injeções bilaterais no NPBL de metisergida, proglumide ou DNQX, respectivamente, aumentam a ingestão de solução hipertônica de NaCl induzida por tratamento com o diurético furosemida combinado com doses baixas do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril injetados subcutaneamente. Metisergida injetada no NPBL ainda aumenta a ingestão de NaCl induzida por ANG II administrada no ventrículo lateral (VL) ou no órgão subfornical (OSF) e por privação hídrica por 24 h, depleção de sódio ou DOCA. Além disso, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções de moxonidina ou noradrenalina no NPBL aumenta a ingestão de NaCl induzida por furosemida + captopril. Sendo assim, esses estudos mostram que o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL com injeções de antagonistas de receptores serotoninérgicos, colecistocinérgicos e glutamatérgicos ou agonistas de receptores adrenérgicos aumenta a ingestão de NaCl e água induzida por tratamentos prévios. No entanto, mais recentemente mostrou-se que a ativação gabaérgica do NPBL induz ingestão de NaCl e água em ratos saciados e normovolêmicos que não receberam nenhum tratamento prévio. Essa resposta é reduzida pelo bloqueio dos mecanismos colinérgicos centrais. No presente estudo,

investigamos o efeito da desativação de mecanismos prosencefálicos facilitatórios na ingestão de NaCl e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL. Em ratos com cânulas-guia implantadas no VL ou OSF e bilateralmente no NPBL, foram estudados os efeitos do bloqueio dos receptores angiotensinérgicos AT₁ com injeções intracerebroventriculares (i.c.v.) de losartan combinado ou não com o bloqueio dos receptores colinérgicos centrais com injeção i.c.v. de atropina na ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por muscimol no NPBL. O envolvimento do OSF na resposta induzida pelo muscimol no NPBL também foi investigado com injeções de losartan e atropina nessa área. Ainda foram testados os efeitos da ativação dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos com injeção i.c.v. de moxonidina na ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL e, a fim de se verificar a especificidade dos efeitos da moxonidina, também foram testados seus efeitos na ingestão de sacarose 2%. Em ratos que receberam injeção i.c.v. de veículo, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($31,7 \pm 1,8$ ml/4 h, vs. salina: $0,4 \pm 0,3$ ml/4h) e água ($21,5 \pm 2,0$ ml/4 h, vs. salina: $0,8 \pm 0,2$ ml/4 h). Injeção i.c.v. de losartan (50 e 100 μ g/1,0 μ l) reduziu os efeitos da injeção de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL na ingestão de NaCl 0,3 M ($18,9 \pm 2,0$ e $9,9 \pm 1,7$ ml/4 h, respectivamente) e água ($9,8 \pm 1,7$ e $5,1 \pm 1,1$ ml/4 h, respectivamente). Em outro grupo de animais, injeção i.c.v. de losartan (100 μ g/1,0 μ l) ou atropina (20 nmol/1,0 μ l) reduziu os efeitos do muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) injetado no NPBL na ingestão de NaCl 0,3 M ($15,6 \pm 2,4$ ml/4 h e $11,5 \pm 1,4$ ml/4 h, respectivamente, vs. veículo i.c.v.: $38,0 \pm 4,8$ ml/4 h) e água ($9,4 \pm 3,0$ ml/4 h e $2,0 \pm 0,4$ ml/4 h, respectivamente, vs. veículo i.c.v.: $16,7 \pm 4,0$ ml/4 h). Porém, a associação dos dois tratamentos (losartan + atropina i.c.v.) não produziu redução adicional dos efeitos do muscimol injetado no NPBL na ingestão de NaCl 0,3 M ($12,4 \pm 1,8$ ml/4 h) e água ($4,1 \pm 1,4$ ml/4 h). Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL em ratos que receberam injeção de veículo no OSF também induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($34,5 \pm 2,2$ ml/4 h, vs.

salina: $0,4 \pm 0,1$ ml/4 h) e água ($12,7 \pm 2,4$ ml/4 h, vs. salina: $0,2 \pm 0,1$ ml/4 h). Injeções de losartan ($1 \mu\text{g}/0,1 \mu\text{l}$) ou atropina ($2 \text{ nmol}/0,1 \mu\text{l}$) no OSF reduziram os efeitos do muscimol injetado no NPBL na ingestão de NaCl 0,3 M ($6,6 \pm 1,9$ ml/4 h e $8,4 \pm 2,2$ ml/4 h, respectivamente) e aboliram a ingestão de água ($4,0 \pm 1,0$ ml/4 h e $2,5 \pm 1,0$ ml/4 h, respectivamente). A injeção de moxonidina ($20 \text{ nmol}/1,0 \mu\text{l}$) no VL aboliu os efeitos do muscimol na ingestão de NaCl 0,3 M ($1,5 \pm 0,9$ ml/4 h, vs. veículo i.c.v.: $22,3 \pm 1,0$ ml/4 h) e água ($1,4 \pm 1,2$ ml/4 h, vs. veículo i.c.v.: $11,2 \pm 2,9$ ml/4 h), mas também reduziu a ingestão de sacarose 2% ($1,4 \pm 1,0$ ml/2 h, vs. veículo i.c.v.: $3,7 \pm 0,9$ ml/2 h) sem alterar a ingestão de água ($0,1 \pm 0,0$ ml/2 h, vs. veículo i.c.v.: $0,4 \pm 0,2$ ml/2 h). Os resultados sugerem que os mecanismos facilitatórios prosencefálicos angiotensinérgico e colinérgico, particularmente os localizados no OSF, estão envolvidos igualmente na ingestão de água e especialmente de NaCl induzida pela ativação gabaérgica do NPBL. Além disso, a ativação do mecanismo inibitório prosencefálico adrenérgico α_2 /imidazólico também inibe a ingestão de NaCl e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL, o que mais uma vez sugere o envolvimento de mecanismos prosencefálicos na ingestão de NaCl e água que ocorre após a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL com injeções de muscimol. Os efeitos da moxonidina, porém, talvez possam ser resultado de ações inespecíficas, já que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos também reduz outros comportamentos ingestivos, como ingestão de sacarose. Portanto, parece que a atividade dos mecanismos angiotensinérgico e colinérgico centrais é essencial para a ingestão de NaCl e água produzida pela desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL com injeções de muscimol nessa área em ratos saciados e normovolêmicos.

Palavras-chave: muscimol, angiotensina II, acetilcolina, órgão subfornical.

Roncari CF. Forebrain mechanisms involved on sodium and water intake induced by gabaergic activation of the lateral parabrachial nucleus [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 2010.

ABSTRACT

Recent studies have shown important mechanisms for the control of sodium and water intake in the lateral parabrachial nucleus (LPBN), a pontine structure localized dorsolaterally to the superior cerebellar peduncle. Electrolytic or neurotoxic lesions of the LPBN increase water intake induced by central or peripheral administration of angiotensin II (ANG II). The blockade of serotonergic, cholecystokinergic or glutamatergic receptors with bilateral injections of methysergide, proglumide or DNQX, respectively, into the LPBN increases hypertonic NaCl intake induced by the treatment with subcutaneous injections of diuretic furosemide combined with low dose of angiotensin converting enzyme inhibitor captopril. LPBN injections of methysergide also increases NaCl intake induced by ANG II injected in the lateral ventricle (LV) or into the subfornical organ (SFO) and 24 h water deprivation, sodium depletion or DOCA. Moreover, activation of α_2 -adrenoceptors with injections of moxonidine or noradrenaline into the LPBN also increases NaCl intake induced by furosemide + captopril. Therefore these studies have shown that blockade of LPBN inhibitory mechanisms with injections of serotonergic, cholecystokinergic or glutamatergic antagonists or adrenergic agonists increase NaCl and water intake induced by treatments that induce water and/or NaCl intake. However, recently it has been shown that GABAergic activation of the LPBN induces NaCl and water intake in satiated and normovolemic rats that received no previous treatment, a response reduced by the blockade of central cholinergic mechanisms. In the present study, we investigated the effects of deactivation of forebrain facilitatory mechanisms on NaCl and water intake induced by gabaergic activation of the

LPBN. Rats with stainless steel cannulas implanted into the LV or SFO and bilaterally into the LPBN were used to test the effects of the blockade of central angiotensinergic AT₁ receptors with losartan injected intracerebroventricularly (i.c.v.) combined or not with the blockade of central cholinergic receptors with i.c.v. atropine on LPBN muscimol-induced 0.3 M NaCl and water intake. The involvement of the SFO on LPBN-muscimol responses was also investigated with injection of losartan and atropine into this area. In addition, we also tested the effects of the activation of α_2 -adrenergic/imidazoline receptors with i.c.v. moxonidine on 0.3 M NaCl and water intake induced by gabaergic activation of the LPBN. In order to test the specificity of moxonidine to inhibit water and NaCl intake, we also tested its effects on 2% sucrose intake. In rats that received i.c.v. injection of vehicle, bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN induced 0.3 M NaCl (31.7 \pm 1.8 ml/4 h, vs. saline: 0.4 \pm 0.3 ml/4h) and water intake (21.5 \pm 2.0 ml/4 h, vs. saline: 0.8 \pm 0.2 ml/4 h). Losartan (50 and 100 μ g/1.0 μ l) injected i.c.v. reduced the effects of LPBN-muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) on 0.3 M NaCl (18.9 \pm 2.0 and 9.9 \pm 1.7 ml/4 h, respectively) and water intake (9.8 \pm 1.7 and 5.1 \pm 1.1 ml/4 h, respectively). In another group of rats, i.c.v. injection of losartan (100 μ g/1.0 μ l) or atropine (20 nmol/1.0 μ l) reduced the effects of muscimol into the LPBN on 0.3 M NaCl (15.6 \pm 2.4 ml/4 h and 11.5 \pm 1.4 ml/4 h, respectively, vs. vehicle i.c.v.: 38.0 \pm 4.8 ml/4 h) and water intake (9.4 \pm 3.0 ml/4 h and 2.0 \pm 0.4 ml/4 h, respectively, vs. vehicle i.c.v.: 16.7 \pm 4.0 ml/4 h). However, association of both treatments (i.c.v. losartan + atropine) did not produce additional reduction on muscimol effects on 0.3 M NaCl (12.4 \pm 1.8 ml/4 h) and water intake (4.1 \pm 1.4 ml/4 h). Bilateral injections of muscimol (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN in rats that received vehicle into the SFO also induced 0.3 M NaCl (34.5 \pm 2.2 ml/4 h, vs. saline: 0.4 \pm 0.1 ml/4 h) and water intake (12.7 \pm 2.4 ml/4 h, vs. saline: 0.2 \pm 0.1 ml/4 h). Injections of losartan (1 μ g/0.1 μ l) or atropine (2 nmol/0.1 μ l) into the SFO reduced the effects of muscimol into the LPBN on 0.3 M NaCl intake (6.6 \pm 1.9 ml/4 h and 8.4 \pm 2.2

ml/4 h, respectively) and abolished water intake (4.0 ± 1.0 ml/4 h and 2.5 ± 1.0 ml/4 h, respectively). Injection of moxonidine (20 nmol/1.0 μ l) into the LV abolished the effects of muscimol into the LPBN on 0.3 M NaCl (1.5 ± 0.9 ml/4 h, vs. vehicle i.c.v.: 22.3 ± 1.0 ml/4 h) and water intake (1.4 ± 1.2 ml/4 h, vs. vehicle i.c.v.: 11.2 ± 2.9 ml/4 h), but also reduced 2% sucrose intake (1.4 ± 1.0 ml/2 h, vs. vehicle i.c.v.: 3.7 ± 0.9 ml/2 h) without affecting water intake (0.1 ± 0.0 ml/2 h, vs. vehicle i.c.v.: 0.4 ± 0.2 ml/2 h) in the same rats. The results suggest that forebrain angiotensinergic and cholinergic facilitatory mechanisms, particularly of the SFO, are similarly involved on water and specially NaCl intake induced by gabaergic activation of the LPBN. Moreover, the activation of forebrain α_2 -adrenergic/imidazoline inhibitory mechanisms inhibits NaCl and water intake induced by gabaergic activation of the LPBN, suggesting again the involvement of forebrain mechanisms on NaCl and water intake after deactivation of LPBN inhibitory mechanisms with muscimol injection. However, moxonidine i.c.v. also reduced sucrose intake, which suggests that activation of central α_2 -adrenergic/imidazoline receptors may also produce non specific inhibition of ingestive behaviors. Therefore it seems that the activity of angiotensinergic and cholinergic mechanisms is essential for the release of NaCl intake produced by the deactivation of LPBN inhibitory mechanisms with injections of muscimol into this area in satiated and normovolemic rats.

Keywords: muscimol, angiotensin II, acetylcholine, subfornical organ.

1 INTRODUÇÃO

A todo instante perdemos água e eletrólitos, principalmente sódio, pela respiração, suor e predominantemente pela excreção urinária. A água e o sódio são fundamentais para a manutenção da quantidade e da concentração dos líquidos corporais, garantindo o perfeito funcionamento das células e a manutenção da pressão arterial. Portanto, em situações de alterações de volume ou da osmolaridade dos líquidos corporais, diferentes mecanismos são ativados. A ativação desses mecanismos, por promover ajustes na ingestão e excreção de água e sódio, normalmente permite restabelecer o equilíbrio hidroeletrólítico do organismo. A ingestão de água e de NaCl, ou apenas de água, é estimulada diante de uma hipovolemia ou de aumento da osmolaridade. Nessas situações, receptores localizados em diversas partes do organismo (por exemplo, receptores de volume localizados no sistema cardiovascular e osmorreceptores) ou hormônios produzidos sinalizam para algumas regiões específicas do cérebro que, uma vez ativadas, desencadeiam respostas renais e/ou comportamento de busca por água (sede) e sódio (apetite ao sódio)^{48,78}.

Um pequeno aumento de 1 a 2% na pressão osmótica efetiva do plasma resulta na estimulação da sede em mamíferos. Trabalhos pioneiros mostraram um importante papel da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) nos mecanismos da sede, pois a ablação da região AV3V de carneiros e ratos causa adipisia^{1,47}. Em estudos subsequentes, novas evidências confirmaram que os osmorreceptores estão localizados no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e no órgão subfornical (OSF)^{47,80,81}. O OSF e o OVLT são dois órgãos circumventriculares situados na lâmina terminal fora da barreira hematoencefálica. Trabalhos eletrofisiológicos e imunohistoquímicos sugerem que os neurônios dos órgãos circumventriculares são ativados através de suas células osmo-sódio- e angiotensina II-sensíveis durante um aumento da osmolaridade do líquido extracelular ou uma deficiência aguda de sódio corporal, respectivamente^{47,68,80,81}. O núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o

qual também faz parte da região AV3V, recebe aferências dos neurônios do OSF e OVLT e pode integrar sinais neurais vindos desses órgãos circumventriculares com as informações sensoriais viscerais vindas do tronco cerebral⁵⁵.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um importante sistema hormonal ativado em situações de hipovolemia. A renina, uma enzima proteolítica, atua sobre o substrato plasmático, o angiotensinogênio (uma proteína globular sintetizada no fígado), produzindo a angiotensina I (ANG I). A ANG I sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), localizada especialmente nos endotélios da circulação pulmonar, produz a angiotensina II (ANG II). Fatores como redução da pressão de perfusão arterial renal, redução da concentração do íon sódio para a mácula densa, aumento da atividade do nervo renal, ativação dos receptores adrenérgicos do subtipo β_1 , catecolaminas ou prostaglandinas circulantes, ativam a secreção de renina³². A ANG II apresenta inúmeras funções fisiológicas, como regulação da pressão arterial e secreção de vasopressina, além de estimular a ingestão de água e/ou sódio, tanto por suas ações periféricas (controle da secreção de aldosterona), quanto pela ação direta em algumas áreas do cérebro, como a região AV3V e o OSF, principais áreas do cérebro onde estão localizados os receptores para esse peptídeo^{11,53,74}. A administração periférica ou intracerebroventricularmente (i.c.v.) de inibidores da ECA diminui a ingestão de sódio em animais depletados deste íon^{32,64,82,83}. Tanto o inibidor da ECA captopril ou o antagonista de receptores AT_1 losartan perifericamente, como losartan ou PD123319 (antagonista de receptores AT_2) centralmente reduzem a ingestão de solução hipertônica de NaCl induzida por privação hídrica ou depleção de sódio⁷². Assim, verifica-se que a ANG II tem um importante papel na ingestão de sódio induzida por diferentes protocolos. A aldosterona, um mineralocorticoide, também tem papel fundamental na conservação do sódio no organismo. A secreção de aldosterona pela zona fasciculada da adrenal é regulada pela ANG II e concentração extracelular de potássio. A aldosterona tem

ações renais, regulando a reabsorção de sódio e secreção de potássio⁹, e ações centrais em áreas como no núcleo central da amígdala (CeA), induzindo o apetite ao sódio^{39,70}. Além disso, o NTS contém uma subpopulação de neurônios que co-expressam receptores da aldosterona e a enzima 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (HSD2), o que os torna sensíveis apenas à aldosterona. Esses neurônios também estariam envolvidos na modulação do apetite ao sódio, que é aumentado pela aldosterona^{40,41}.

Paralelamente à atuação dos mecanismos que facilitam a ingestão de água e de NaCl, como os acima citados, o organismo também dispõe de mecanismos inibitórios da ingestão de água e de NaCl que atuam limitando a ingestão nas situações em que o equilíbrio está presente, ou seja, esses mecanismos sinalizam para que ocorra a saciedade. A ocitocina (OT) e o peptídeo natriurético atrial (ANP) são secretados na circulação sanguínea durante expansão de volume, particularmente durante expansão hipertônica, e ambos tem ação natriurética, um mecanismo importante para compensar ou pelo menos atenuar essa expansão⁵⁴. Complementando a ação renal, esses hormônios também inibem a sede e o apetite ao sódio. Injeção de ANP no ventrículo lateral (VL) reduz a ingestão de água e de NaCl induzidos por privação hídrica, por depleção de sódio ou por injeção central de ANG II^{6,54}. Aumento na ingestão de sódio ocorre por injeção intracerebral de anticorpo para ANP³³. Os níveis plasmáticos de OT aumentam em resposta a uma carga osmótica e este aumento é revertido em resposta à diluição do líquido extracelular durante a ingestão de água que precede o apetite ao sódio em animais hipovolêmicos^{8,79}. Injeção i.c.v. de OT reduz a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio e a injeção de antagonista de OT potencializa a ingestão de NaCl induzida por ANG II^{71,79}. Concomitante à ativação de mecanismos facilitatórios do apetite ao sódio (ANG II, aldosterona, desativação de receptores de volume), ocorreria a liberação de OT centralmente que inibiria o apetite ao sódio nas fases iniciais de hipovolemia. Mais tarde, com a ingestão de água, os mecanismos inibitórios seriam

desativados pela redução da osmolaridade extracelular, liberando então a ação dos mecanismos facilitatórios para a ingestão de sódio^{8,79}.

No tronco cerebral, um importante mecanismo inibitório da ingestão de água e sódio foi recentemente descoberto no núcleo parabraquial lateral (NPBL)^{2,13,19,21,29,57-60,63,66,67}. O NPBL é uma estrutura pontina que recebe projeções aferentes da área postrema (AP) e da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) e que faz conexões com áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrólítico, como núcleos específicos do hipotálamo e amígdala^{15,43,44,51}. Assim, um papel importante do NPBL seria integrar as informações ascendentes do NTSm e AP que, por sua vez, poderiam influenciar a atividade das áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico. Lesões eletrólíticas ou químicas (ácido ibotênico) e injeção de lidocaína no NPBL aumentam a ingestão de água induzida por injeção central ou periférica de ANG II, bem como por outros estímulos relacionados com a formação de ANG II, sugerindo um papel inibitório do NPBL sobre o controle da ingestão de água^{29,48,65,66}. Injeções bilaterais no NPBL de metisergida, um antagonista de receptores serotoninérgicos, aumentam a ingestão de NaCl induzida pela ANG II administrada tanto i.c.v. quanto no OSF^{16,63}. Metisergida injetada bilateralmente no NPBL também aumenta a ingestão de NaCl em animais submetidos à depleção de sódio, tratamento com injeções do diurético furosemida combinado com o bloqueador da enzima conversora de angiotensina captopril em baixa dose, ambos injetados subcutaneamente (s.c.) e tratamento com desoxicorticosterona (DOCA – composto esteróide com propriedades semelhantes à aldosterona)^{21,58,63}. Por outro lado, a injeção de DOI (agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) no NPBL reduz a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento com furosemida + captopril⁶³.

Além da serotonina, também a colecistocinina (CCK) no NPBL tem um papel inibitório na ingestão de água e sódio⁶⁰, demonstrando-se, inclusive, uma interdependência e cooperatividade entre serotonina (5-HT) e CCK no NPBL no controle da ingestão de água e

NaCl²⁰. Estudos mais recentes mostraram que paralelamente à 5-HT e CCK, vários outros neurotransmissores e receptores participam do controle da ingestão de NaCl no NPBL. Dentre esses neurotransmissores, o fator liberador de corticotrofina e o glutamato ativam esse mecanismo inibitório reduzindo ou limitando a ingestão de sódio, enquanto a ativação de receptores gabaérgicos, opioidérgicos e adrenérgicos α_2 no NPBL bloqueiam o mecanismo inibitório levando a uma intensa ingestão de NaCl por ratos saciados ou estimulados a ingerir NaCl^{2,13,27}. Portanto, pelo que se sabe até hoje parecem existir neurotransmissores que ativam e outros que desativam ou bloqueiam o mecanismo inibitório da ingestão de NaCl presente no NPBL.

Injeções de antagonistas da serotonina, colecistocinina, fator liberador de corticotrofina e glutamato, assim como agonistas de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL aumentam a ingestão de sódio em ratos submetidos a algum tratamento que estimule a ingestão de sódio^{2,3,18,21,27,58,63,84}. Porém, em ratos saciados e normovolêmicos esses mesmos tratamentos não produzem nenhum efeito na ingestão de sódio. Isso levou à hipótese de que a ingestão de sódio só ocorreria quando, simultaneamente, mecanismos facilitatórios fossem ativados e mecanismos inibitórios fossem desativados^{16,56,63}. No entanto, resultados mais recentes mostraram que somente injeções bilaterais de agonistas gabaérgicos ou opioidérgicos no NPBL induzem uma intensa ingestão de NaCl em ratos saciados e normovolêmicos^{13,25}. Esses estudos demonstraram que a ativação de receptores GABA_A (com injeções bilaterais de muscimol) e GABA_B (com injeções bilaterais de baclofen) no NPBL induz intensa ingestão de NaCl e água em ratos saciados, normalmente hidratados e sem nenhum tratamento prévio¹³, sugerindo um envolvimento do aminoácido inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA) no NPBL no controle da ingestão de sódio. Ou seja, parece que apenas a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL pela inibição dos neurônios do NPBL pela ativação de receptores gabaérgicos seria suficiente para induzir ingestão de NaCl e água. Um ponto a ser

completamente esclarecido é como a inibição do NPBL com a ativação gabaérgica poderia estimular a ingestão de água e sódio.

Um aumento paradoxal da ingestão de NaCl hipertônico além da ingestão normal de água foi recentemente descrito quando o bloqueio serotoninérgico ou a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL foram combinados com o aumento da osmolaridade plasmática produzido por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M^{3,22}. Segundo modelo proposto por De Luca Jr. et al.²², os osmorreceptores ou receptores de sódio ativam circuitos que desencadeiam a sede e o apetite ao sódio, porém, há uma inibição paralela do apetite ao sódio pelos mecanismos inibitórios do NPBL que neutralizariam os efeitos facilitatórios da ingestão de NaCl produzidos pela ativação de osmorreceptores. Considerando-se que, de acordo com a proposta de De Luca Jr. et al.²², os sinais facilitatórios produzidos pela ativação de osmorreceptores poderiam não apenas estimular a ingestão de água, mas também estimular a ingestão de NaCl se o mecanismo inibitório do NPBL estiver bloqueado e que mecanismos colinérgicos centrais seriam importantes para a sinalização produzida pelos osmorreceptores⁵², realizou-se um estudo para testar a participação dos mecanismos colinérgicos na ingestão de NaCl e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL. Os resultados mostraram que o bloqueio dos mecanismos colinérgicos reduz a ingestão de NaCl e água induzida pelo muscimol no NPBL, evidenciando que os mecanismos colinérgicos são essenciais para a resposta induzida pelo muscimol injetado no NPBL⁷.

Resultados recentes obtidos no laboratório mostraram que também a lesão da região AV3V reduz a ingestão de NaCl e água induzida pela injeção de muscimol no NPBL²⁴. Como a região AV3V é muito importante para as respostas produzidas pela ANG II, entre elas a ingestão de água e NaCl^{10,11}, é possível que a ingestão de NaCl e água produzida pela injeção de muscimol no NPBL também dependa da ativação de receptores angiotensinérgicos da região AV3V ou mesmo do OSF que tem fortes conexões com a região AV3V^{46,50}.

Sabe-se também que a ingestão de água e de sódio induzida pelos mais diferentes tipos de estímulos até hoje testados é altamente influenciada por um mecanismo inibitório localizado em áreas prosencefálicas e que é ativado pelos receptores adrenérgicos α_2 . Esse mecanismo, ativado pela administração central ou periférica de moxonidina ou clonidina (agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos), inibe a ingestão de água e/ou NaCl induzida por diferentes protocolos experimentais, como privação hídrica de 24 h, infusão de salina hipertônica, estimulação angiotensinérgica ou colinérgica centrais, depleção de sódio, injeção i.c.v. de renina e injeção periférica de DOCA^{12,14,23,26,28,30,31,34-37,62,73,77,85,86}. Outra possibilidade que ainda não foi testada é se a ativação desse mecanismo inibitório prosencefálico reduziria os efeitos induzidos pelas injeções bilaterais de muscimol no NPBL.

2 OBJETIVO

Investigar a participação de mecanismos prosencefálicos na ingestão de NaCl e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL, avaliando-se os efeitos na ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL após 1) bloqueio dos receptores AT₁ com injeções de losartan no VL; 2) bloqueio combinado dos receptores AT₁ e colinérgicos com injeções i.c.v. de losartan e atropina; 3) bloqueio dos receptores AT₁ ou colinérgicos com injeções de losartan ou atropina no OSF; 4) ativação dos receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos com injeções i.c.v. de moxonidina.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 290 e 310 g no dia da cirurgia cerebral, provenientes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração Guabi, água e NaCl 0,3 M e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas às 7h), no Laboratório Experimental de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr, UNESP, Araraquara. Todos os procedimentos experimentais foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA (Proc. CEEA nº 17/2007).

3.2 Cirurgia cerebral

Os ratos foram anestesiados com uma combinação de cetamina (80 mg/kg peso corporal) e xilazina (7 mg/kg peso corporal) administrada intraperitonealmente e posicionados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O crânio foi nivelado utilizando como referência o bregma e o lambda. Duas cânulas-guia de aço inoxidável de 12 x 0,5 mm d.i. (diâmetro interno) foram implantadas bilateralmente direcionadas para o NPBL. Uma terceira cânula-guia foi implantada em direção ao VL ou OSF. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para o posicionamento das cânulas-guia foram: a) NPBL: 9,6 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 3,1 mm abaixo da dura-máter; b) VL: 0,8 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,5 mm abaixo da superfície cranial; c) OSF: 1,2 mm caudal ao bregma, na linha mediana e 2,7 mm abaixo da dura-máter. A extremidade das cânulas-guia foi posicionada no encéfalo 2 mm acima das áreas de interesse. As cânulas-guia foram fixadas utilizando resina acrílica aderida a parafusos presos na calota craniana. Exceto durante as injeções, um mandril de metal foi utilizado para o preenchimento

e fechamento da extremidade externa das cânulas-guia. Ao fim da cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato).

Após a cirurgia, os ratos foram manipulados diariamente e treinados para o procedimento experimental. Os experimentos foram iniciados cinco dias após a cirurgia cerebral.

3.3 Injeção de drogas no encéfalo

As injeções no NPBL, VL e OSF foram feitas utilizando-se seringas Hamilton de 5 µl, conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora. Essa agulha injetora foi introduzida no encéfalo pelas cânulas-guia previamente fixadas no encéfalo. A agulha injetora (0,3 mm d.i.) era 2 mm mais longa que a cânula-guia. O volume de injeção foi de 0,2 µl no NPBL (em cada lado), 1,0 µl no VL e 0,1 µl no OSF.

3.4 Drogas utilizadas

Hidrobrometo de muscimol (Research Biochemicals Internationals – RBI, Natick, MA, USA), agonista de receptores GABA_A, foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no NPBL na concentração de 0,5 nmol/0,2 µl.

Losartan potássico (Galena, Campinas, SP, Brasil), antagonista de receptores AT₁, foi dissolvido em solução salina tamponada (veículo) e administrado no VL e OSF nas concentrações de 50 e 100 µg/1,0 µl e 1 µg/0,1 µl, respectivamente.

Metilbrometo de atropina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), antagonista colinérgico muscarínico, foi dissolvido em solução salina tamponada (veículo) e administrado no VL e OSF nas concentrações de 20 nmol/1,0 µl e 2 nmol/0,1 µl, respectivamente.

Cloridrato de moxonidina (doação da Solvay Pharma, Hannover, Alemanha), agonista adrenérgico α_2 /imidazólico, foi dissolvido em uma mistura de propilenoglicol e água 2:1 (veículo) e administrado no VL na concentração de 20 nmol/1,0 μ l.

3.5 Ingestão de NaCl 0,3 M e água

A ingestão de NaCl 0,3 M e água foi testada em ratos mantidos em suas gaiolas. Durante a execução dos experimentos, os ratos não tiveram acesso a ração. A solução de NaCl 0,3 M e a água foram oferecidas em buretas graduadas (divisão de 0,1 ml). Logo após as injeções no NPBL, as buretas foram oferecidas e a ingestão de NaCl 0,3 M e água foi medida a cada 30 minutos durante 4 horas. As injeções no VL e OSF foram feitas previamente às injeções no NPBL. No experimento em que losartan e atropina foram injetados conjuntamente, losartan foi injetado 15 minutos antes da atropina. Foi guardado um intervalo de, no mínimo, 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.6 Ingestão de sacarose 2% e água

Após o período de recuperação da cirurgia cerebral, os animais foram treinados para a ingestão de sacarose 2%. Para isso, os animais tiveram à disposição solução de sacarose 2% por 2 horas diariamente. Assim que se observou uma estabilidade no volume ingerido de sacarose 2% foram feitos os experimentos.

A ingestão de sacarose 2% e água foi testada em ratos mantidos em suas gaiolas. Durante a execução dos experimentos, os ratos não tiveram acesso a ração. A solução de sacarose 2% e água foram oferecidas em buretas graduadas (divisão de 0,1 ml). Quinze minutos após a injeção no VL, as buretas foram oferecidas e a ingestão de sacarose 2% e água foi medida a cada 30 minutos durante 2 horas. Foi guardado um intervalo de, no mínimo, 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.7 Análise histológica

Terminados os experimentos, os ratos receberam injeção de corante (azul de Evans a 2%) em cada cânula-guia no mesmo volume utilizado para a injeção de drogas. Em seguida, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de 50 ml de solução de formalina 10%. A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos nos sítios de injeção com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos montados em lâmina foram corados pelo método de Giemsa e analisados em microscópio para a localização dos sítios de injeções no NPBL, VL e OSF.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média (E.P.M.) foram representados em gráficos ou tabelas. A análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Newman Keuls foram utilizados para as comparações entre os diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

3.9 Protocolos experimentais

3.9.1 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de losartan.

Para testar os efeitos do losartan, a ingestão de NaCl 0,3 M e água foi medida nas seguintes condições: 1) injeção de veículo (solução salina tamponada) no VL e salina no NPBL 2) injeção de veículo no VL e muscimol no NPBL; 3) injeção de losartan (50 µg/1,0 µl) no VL e muscimol no NPBL; 4) injeção de losartan (100 µg/1,0 µl) no VL e muscimol no NPBL. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu

um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A sequência dos tratamentos em cada rato nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final de todos os experimentos cada rato havia recebido os quatro tratamentos.

3.9.2 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. combinada de losartan e atropina.

Para testar os efeitos da injeção i.c.v. combinada de losartan e atropina a ingestão de NaCl 0,3 M e água foi medida nas seguintes condições: 1) injeção de veículo (solução salina tamponada) no VL e salina no NPBL 2) injeção de veículo no VL e muscimol no NPBL; 3) injeção de losartan (100 µg/1,0 µl) no VL e muscimol no NPBL; 4) injeção de atropina (20 nmol/1,0 µl) no VL e muscimol no NPBL; 5) injeção de losartan e atropina no VL e muscimol no NPBL. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A sequência dos tratamentos em cada rato nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final de todos os experimentos cada rato havia recebido os cinco tratamentos.

3.9.3 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção de losartan ou atropina no OSF.

Para testar os efeitos da injeção de losartan ou atropina no OSF a ingestão de NaCl 0,3 M e água foi medida nas seguintes condições: 1) injeção de veículo (solução salina tamponada) no OSF e salina no NPBL 2) injeção de veículo no OSF e muscimol no NPBL; 3) injeção de losartan (1 µg/0,1 µl) no OSF e muscimol no NPBL; 4) injeção de atropina (2 nmol/0,1 µl) no OSF e muscimol no NPBL. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A sequência dos tratamentos em cada rato nos diferentes

experimentos foi aleatória e ao final de todos os experimentos cada rato havia recebido os quatro tratamentos.

3.9.4 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.

Para testar os efeitos da moxonidina a ingestão de NaCl 0,3 M e água foi medida nas seguintes condições: 1) injeção de veículo (propilenoglicol e água 2:1) no VL e salina no NPBL 2) injeção de veículo no VL e muscimol no NPBL; 3) injeção de moxonidina (20 nmol/1,0 µl) no VL e muscimol no NPBL. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A sequência dos tratamentos em cada rato nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final de todos os experimentos cada rato havia recebido os três tratamentos.

3.9.5 Ingestão de sacarose 2% e água em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.

Para testar a especificidade dos efeitos da injeção de moxonidina no VL, após o treinamento para a ingestão de sacarose 2% a ingestão de sacarose 2% e água foi medida nas seguintes condições: 1) injeção de veículo (propilenoglicol e água 2:1) no VL; 2) injeção de moxonidina (20 nmol/1,0 µl) no VL. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu um dos tratamentos descritos acima e a outra metade recebeu outro tratamento. A sequência dos tratamentos em cada rato nos diferentes experimentos foi aleatória e ao final dos experimentos cada rato havia recebido os dois tratamentos.

4 RESULTADO

4.1 Análise histológica

Na análise histológica, injeções foram consideradas corretamente posicionadas no VL quando localizadas nas porções central e posterior do ventrículo lateral. Injeções no OSF foram consideradas corretamente posicionadas quando o corante estava visível apenas no parênquima do OSF, não havendo ruptura do epêndima que separa o OSF da porção dorsal do terceiro ventrículo (III-V) e do VL (Figura 1). Nos animais cujos sítios de injeções não atingiram o OSF, estas foram classificadas como: a) injeção na porção dorsal do III-V, quando o epêndima apresentava-se rompido e não havia sinal de injeção no parênquima do OSF ou b) injeção no tecido adjacente ao OSF, quando o sítio de injeção não fora o tecido do OSF ou o III-V. Os ratos com sítio de injeção localizado na extremidade ventral do OSF em uma posição em que pudesse ter ocorrido vazamento para o III-V foram excluídos da análise, já que não era possível classificá-los como tendo injeção apenas no OSF ou apenas no III-V. Para o NPBL, as injeções foram consideradas corretamente posicionadas quando ambas as cânulas estavam direcionadas para as porções lateral dorsal e central (ver Fulwiler, Saper³⁸ para definição dos subnúcleos do NPBL) (Figura 2). Injeções que atingiram a porção lateral ventral e lateral externa, assim como o núcleo Kölliker-Fuse, foram observadas apenas em alguns animais e os resultados desses animais foram incluídos na análise. Os sítios de injeção no NPBL utilizados são similares aos utilizados em estudos prévios que mostraram efeito do muscimol no NPBL na ingestão de água e NaCl ^{7,13,24,25}.

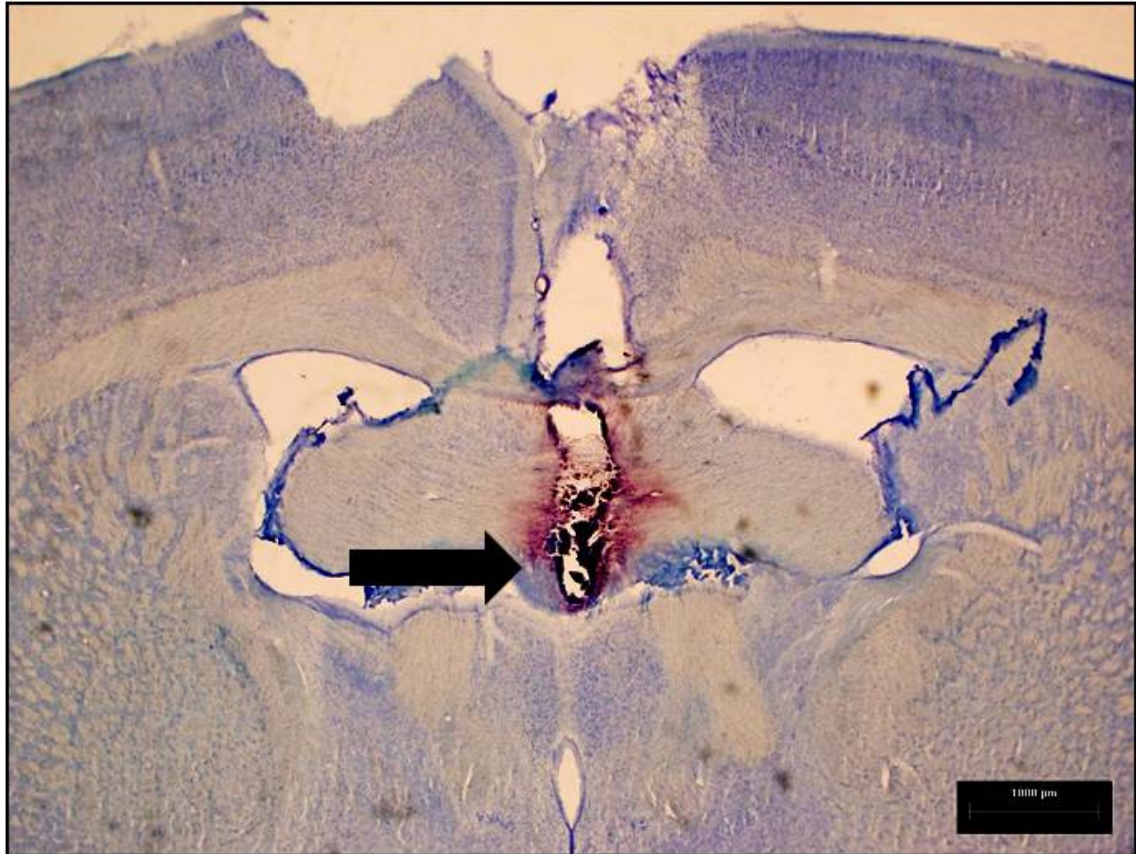


FIGURA 1 – Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando o sítio de injeção no OSF (indicado pela seta). Barra preta = 1000 μm .

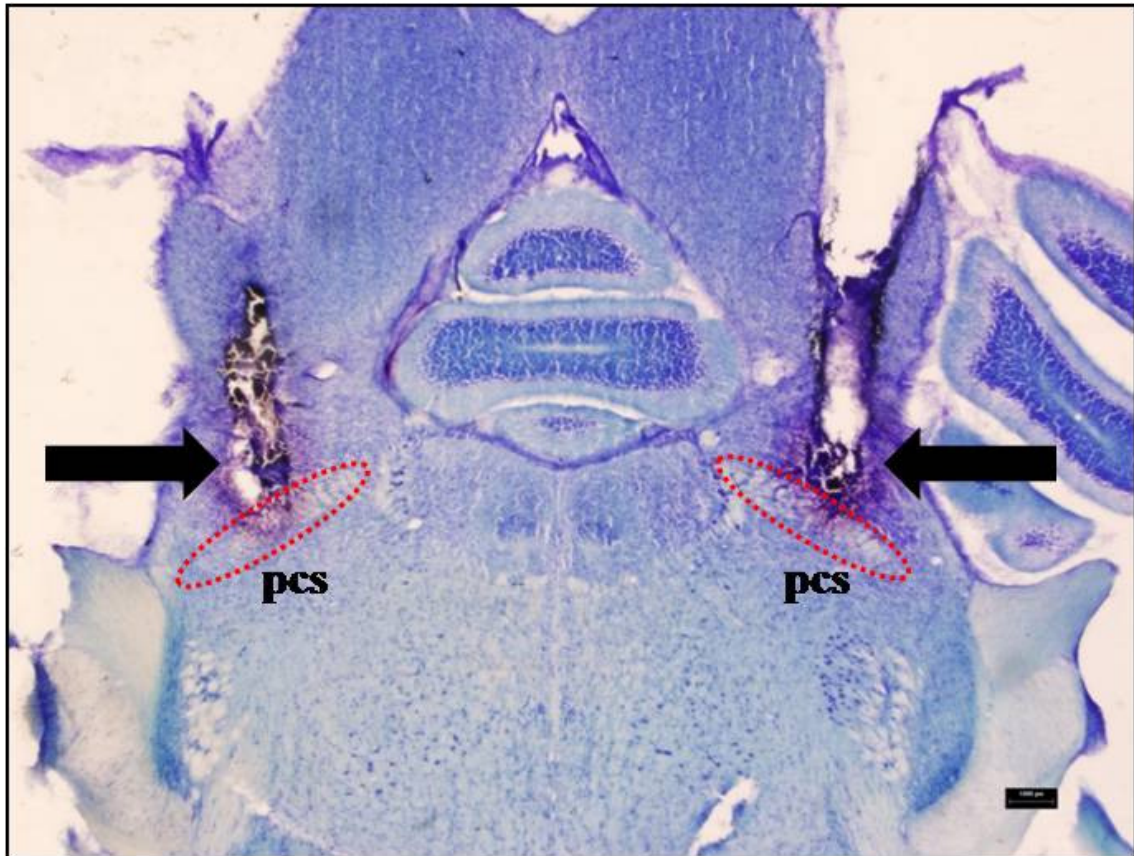


FIGURA 2 – Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas) e pedúnculo cerebelar superior (pcs; destacados pelos círculos pontilhados vermelhos). Barra preta = 1000 µm.

4.2 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de losartan.

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeção i.c.v. de veículo induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($31,7 \pm 1,8$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,4 \pm 0,3$ ml/4 h) [$F(3,33) = 77,38$; $P < 0,05$] e água ($21,5 \pm 2,0$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,8 \pm 0,2$ ml/4 h) [$F(3,33) = 35,41$; $P < 0,05$].

As injeções i.c.v. de losartan (50 e 100 µg/1,0 µl) reduziram de maneira dose-dependente a ingestão de NaCl 0,3 M ($18,9 \pm 2,0$ e $9,9 \pm 1,7$ ml/4 h, respectivamente) e água ($9,8 \pm 1,7$ e $5,1 \pm 1,1$ ml/4 h, respectivamente) induzida pelas injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL (Figura 3).

- veículo i.c.v. + salina NPBL
- ▲ veículo i.c.v. + muscimol NPBL
- losartan (50 µg) i.c.v. + muscimol NPBL
- losartan (100 µg) i.c.v. + muscimol NPBL

* Diferente de veículo i.c.v. + salina NPBL

Diferente de veículo i.c.v. + muscimol NPBL

† Diferente de losartan (50 µg) i.c.v. + muscimol NPBL

n = 12

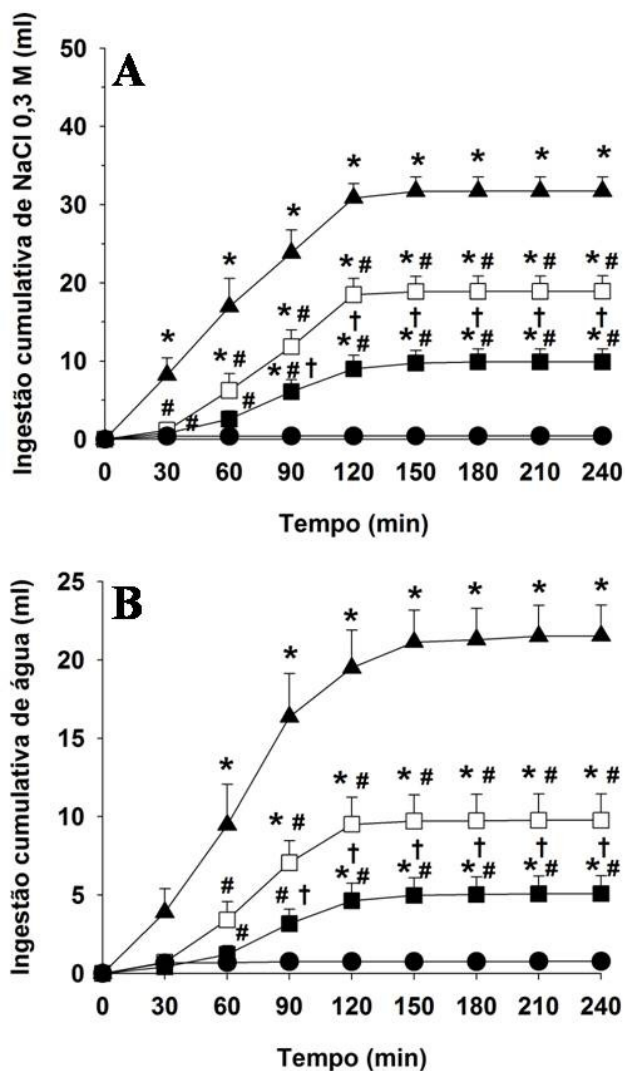


FIGURA 3 – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina no NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan (50 µg/1,0 µl e 100 µg/1,0 µl) ou veículo (solução salina tamponada). Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais.

4.3 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. combinada de losartan e atropina.

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeção i.c.v. de veículo induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($38,0 \pm 4,8$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $1,7 \pm 0,9$ ml/4 h) [$F(4,36) = 15,65$; $P < 0,05$] e água ($16,7 \pm 4,0$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $1,1 \pm 0,6$ ml/4 h) [$F(4,36) = 10,99$; $P < 0,05$].

As injeções i.c.v. de losartan (100 µg/1,0 µl) e atropina (20 nmol/1,0 µl) reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M ($15,6 \pm 2,4$ e $11,5 \pm 1,4$ ml/4 h, respectivamente) e água ($9,4 \pm 3,0$ e $2,0 \pm 0,4$ ml/4 h, respectivamente) induzida pelas injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. A associação das injeções i.c.v. de losartan e atropina reduziu o efeito do muscimol na ingestão de NaCl 0,3 M ($12,4 \pm 1,8$ ml/4 h) e aboliu a ingestão de água ($4,1 \pm 1,4$ ml/4 h), mas a resposta não foi diferente das injeções separadas de losartan e atropina (Figura 4).

- veículo i.c.v. + salina NPBL
- ▲ veículo i.c.v. + muscimol NPBL
- losartan i.c.v. + muscimol NPBL
- atropina i.c.v. + muscimol NPBL
- ◇ losartan + atropina i.c.v. + muscimol NPBL

* Diferente de veículo i.c.v. + salina NPBL

Diferente de veículo i.c.v. + muscimol NPBL

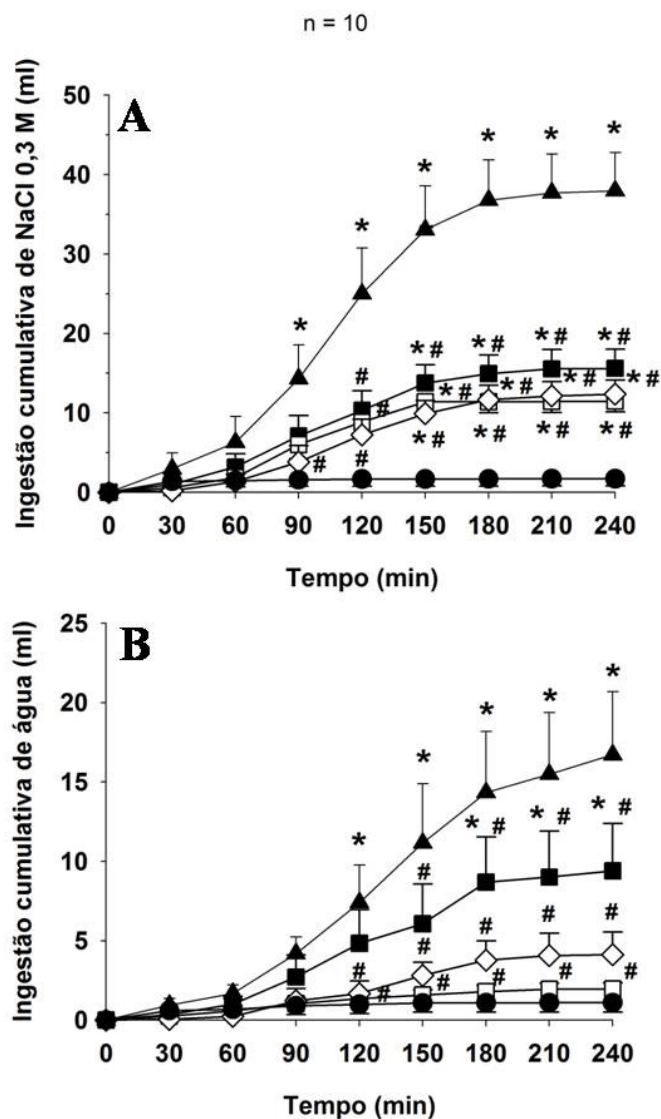


FIGURA 4 – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan (100 μ g/1,0 μ l) e/ou atropina (20 nmol/1,0 μ l) ou veículo (solução salina tamponada). Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais.

4.4 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção de losartan ou atropina no OSF.

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeção i.c.v. de veículo induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($34,5 \pm 2,2$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,4 \pm 0,1$ ml/4 h) [$F(3,24) = 63,90$; $P < 0,05$] e água ($12,7 \pm 2,4$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,2 \pm 0,1$ ml/4 h) [$F(3,24) = 11,42$; $P < 0,05$].

As injeções de losartan (1 µg/0,1 µl) ou atropina (2 nmol/0,1 µl) no OSF reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M ($6,6 \pm 1,9$ e $8,4 \pm 2,2$ ml/4 h, respectivamente) e aboliram a ingestão de água ($4,0 \pm 1,0$ e $2,5 \pm 1,0$ ml/4 h, respectivamente) induzidas pelas injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL (Figura 5).

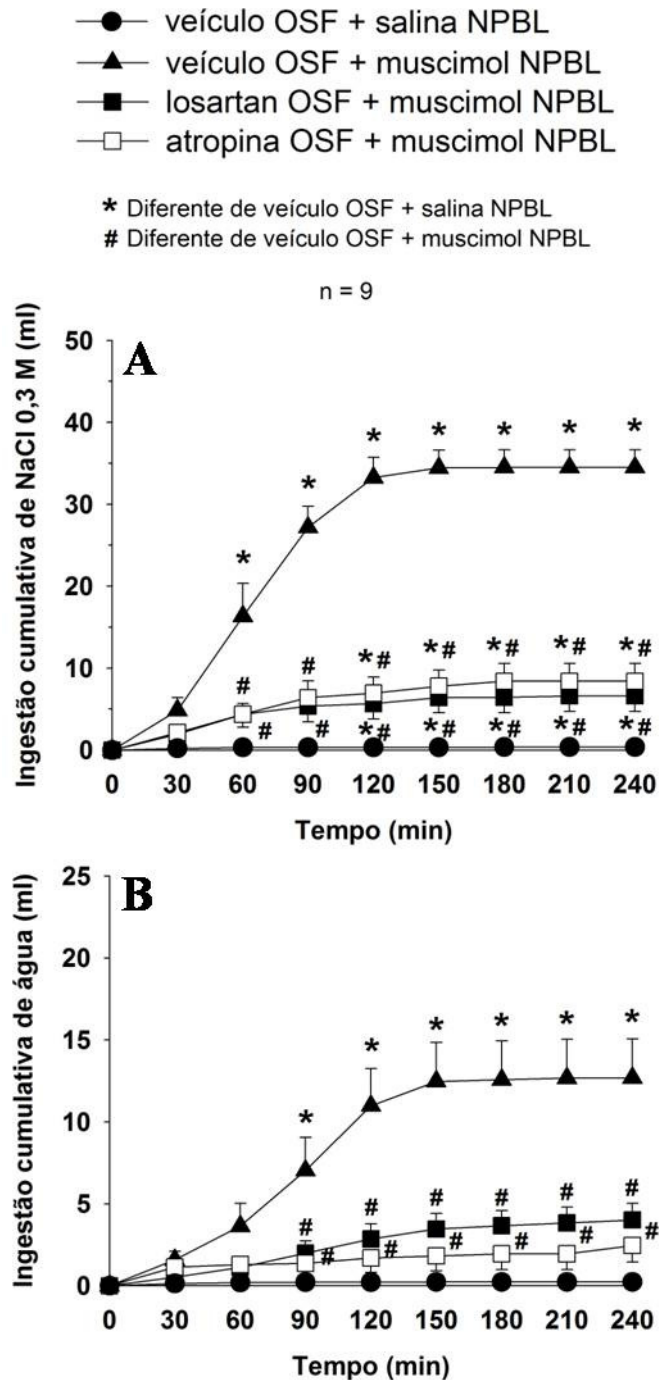


FIGURA 5 – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL combinado com injeção de losartan (1 μ g/0,1 μ l), atropina (2 nmol/0,1 μ l) ou veículo (solução salina tamponada) no OSF. Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais.

4.5 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção de losartan ou atropina fora do OSF.

A especificidade do OSF como local de ação das injeções de losartan ou atropina foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos que receberam injeções de muscimol no NPBL combinado com injeção de losartan ou atropina no III-V ou no tecido adjacente ao OSF. O pré-tratamento com losartan (1 µg/0,1 µl) ou atropina (2 nmol/0,1 µl) no III-V não alterou os efeitos das injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL na ingestão de NaCl 0,3 M (veículo III-V: 32,3 ± 2,3 ml/4 h; losartan III-V: 27,6 ± 1,6 ml/4 h; atropina III-V: 26,6 ± 2,3 ml/4 h) [F(3,21) = 42,55; P < 0,05] e água (veículo III-V: 18,9 ± 2,5 ml/4 h; losartan III-V: 16,3 ± 2,4 ml/4 h; atropina: 15,4 ± 1,6 ml/4 h) [F(3,21) = 24,47; P < 0,05] (Tabela 1). Quando a cânula estava posicionada no tecido adjacente ao OSF, a injeção de losartan (1 µg/0,1 µl) ou atropina (2 nmol/0,1 µl) também não alterou os efeitos do muscimol na ingestão de NaCl 0,3 M (veículo tecido: 39,2 ± 4,3 ml/4 h; losartan tecido: 35,4 ± 4,2 ml/4 h; atropina: 39,9 ± 5,4 ml/4 h) [F(3,15) = 21,48; P < 0,05] e água (veículo tecido: 24,9 ± 1,4 ml/4 h; losartan tecido: 22,1 ± 1,5 ml/4 h; atropina tecido: 23,8 ± 1,9 ml/4 h) [F(3,15) = 86,89; P < 0,05] (Tabela 2).

Tabela 1 – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinado com injeção de losartan, atropina ou veículo no III-V.

Tratamento	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo III-V + salina NPBL	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4
veículo III-V + muscimol NPBL	8,4 ± 4,2*	23,7 ± 3,2*	32,3 ± 2,5*	32,3 ± 2,5*
losartan III-V + muscimol NPBL	2,7 ± 1,3	19,0 ± 3,1*	27,6 ± 1,6*	27,6 ± 1,6*
atropina III-V + muscimol NPBL	4,2 ± 1,6	23,0 ± 1,6*	26,6 ± 2,3*	26,6 ± 2,3*

Tratamento	Ingestão de água (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo III-V + salina NPBL	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4
veículo III-V + muscimol NPBL	2,5 ± 0,6	14,2 ± 2,1*	18,8 ± 2,4*	18,9 ± 2,5*
losartan III-V + muscimol NPBL	1,3 ± 0,6	10,9 ± 2,2*	16,3 ± 2,4*	16,3 ± 2,4*
atropina III-V + muscimol NPBL	1,1 ± 0,5	12,9 ± 1,4*	15,3 ± 1,6*	15,4 ± 1,6*

Valores são representados como média ± E.P.M.; * Diferente de veículo III-V + salina NPBL;

n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), losartan (1 µg/0,1 µl), atropina (2 nmol/0,1 µl), veículo (solução salina tamponada).

Tabela 2 – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina no NPBL combinado com injeção de losartan, atropina ou veículo no tecido adjacente ao OSF.

Tratamento	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo tecido + salina NPBL	1,5 ± 1,3	1,6 ± 1,3	1,7 ± 1,3	1,7 ± 1,3
veículo tecido + muscimol NPBL	8,2 ± 4,8	32,9 ± 4,3*	39,1 ± 4,3*	39,2 ± 4,3*
losartan tecido + muscimol NPBL	9,6 ± 7,3	26,0 ± 7,2*	35,5 ± 5,4*	35,4 ± 4,2*
atropina tecido + muscimol NPBL	10,6 ± 6,1	29,5 ± 3,7*	35,3 ± 4,2*	39,9 ± 5,4*

Tratamento	Ingestão de água (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo tecido + salina NPBL	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
veículo tecido + muscimol NPBL	1,5 ± 1,0	13,1 ± 1,8*	23,8 ± 1,2*	24,9 ± 1,4*
losartan tecido + muscimol NPBL	2,4 ± 1,4	13,9 ± 2,6*	21,5 ± 1,2*	22,1 ± 1,5*
atropina tecido + muscimol NPBL	2,4 ± 1,0	14,3 ± 1,5*	20,1 ± 1,3*	23,8 ± 1,9*

Valores são representados como média ± E.P.M.; * Diferente de veículo tecido + salina NPBL; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), losartan (1 µg/0,1 µl), atropina (2 nmol/0,1 µl), veículo (solução salina tamponada).

4.6 Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos tratados com injeção i.c.v. de veículo induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($22,3 \pm 1,0$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,1 \pm 1,0$ ml/4 h) [$F(2,14) = 13,41$; $P < 0,05$] e água ($11,2 \pm 2,9$ ml/4 h, vs. salina no NPBL: $0,8 \pm 0,5$ ml/4 h) [$F(2,14) = 163,03$; $P < 0,05$].

A injeção i.c.v. de moxonidina (20 nmol/1,0 µl) aboliu a ingestão de NaCl 0,3 M ($1,5 \pm 0,9$ ml/4 h) e água ($1,4 \pm 1,2$ ml/4 h, respectivamente) induzidas pelas injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL (Figura 6).

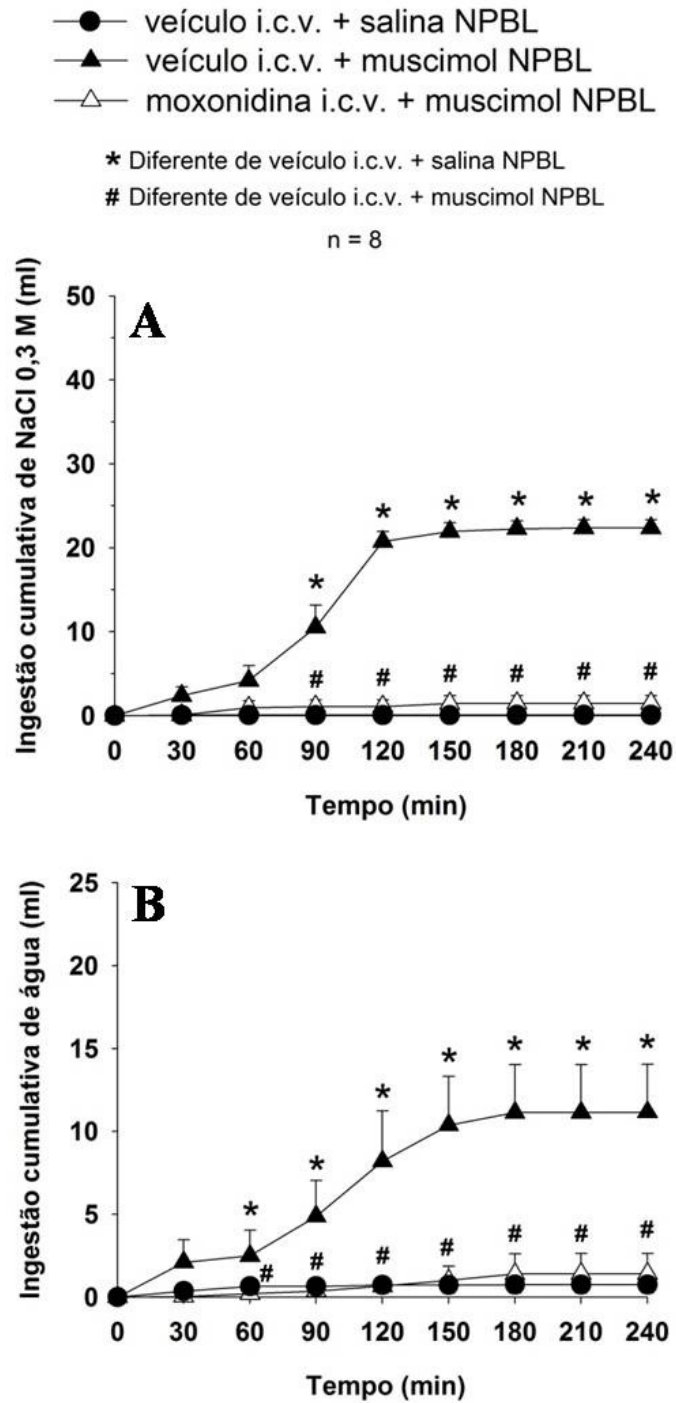


FIGURA 6 – Ingestão cumulativa de (A) NaCl 0,3 M e (B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL combinado com injeção i.c.v. de moxonidina (20 nmol/1,0 μ l) ou veículo (propilenoglicol e água 2:1). Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais.

4.7 Ingestão de sacarose 2% e água em ratos pré-tratados com injeção i.c.v. de moxonidina.

A injeção i.c.v. de moxonidina (20 nmol/1,0 μ l) reduziu a ingestão de sacarose 2% ($1,4 \pm 1,0$ ml/4 h, vs. veículo: $3,7 \pm 0,9$ ml/4 h) [$F(1,7) = 13,57$; $P < 0,05$] sem alterar a ingestão de água ($0,1 \pm 0,0$ ml/4 h, vs. veículo: $0,4 \pm 0,2$ ml/4 h) [$F(1,7) = 4,70$; $P > 0,05$] (Figura 7).

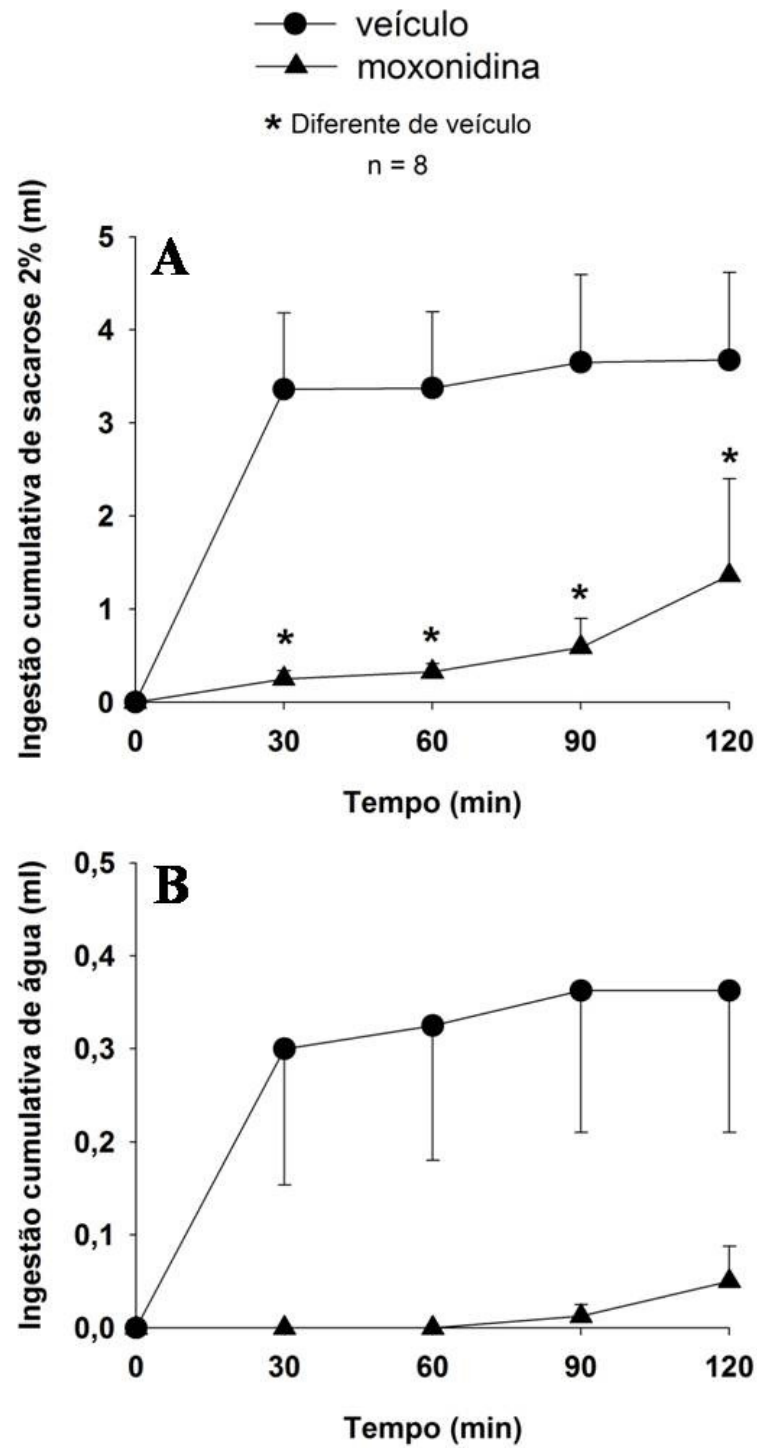


FIGURA 7 – Ingestão cumulativa de (A) sacarose 2% e (B) água após injeção i.c.v. de moxonidina (20 nmol/1,0 μ l) ou veículo (propilenoglicol e água 2:1). Valores são representados como média \pm E.P.M.; n = número de animais.

4.8 Ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos que receberam injeções bilaterais de muscimol fora do NPBL após diferentes pré-tratamentos.

Em alguns animais, ambas as cânulas-guia foram posicionadas fora do NPBL e, portanto, esses animais receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina no tecido adjacente ao NPBL, combinadas com injeção de droga ou veículo no VL ou OSF.

Injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) em tecido adjacente ao NPBL combinado com injeção i.c.v. de veículo não induziram ingestão de NaCl 0,3 M [F(3,9) = 0,74; P > 0,05] ou água [F(3,9) = 1,30; P > 0,05] em ratos saciados e normovolêmicos (Tabela 3). Nesses animais, a injeção i.c.v. de losartan nas diferentes concentrações (50 µg/1,0 µl e 100 µg/1,0 µl) também não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M e água.

No grupo de animais em que foram testados os efeitos da associação dos pré-tratamentos com losartan e atropina, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) fora do NPBL combinadas com injeção i.c.v. de veículo, losartan (100 µg/1,0 µl) e/ou atropina (20 nmol/1,0 µl) não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M [F(4,8) = 1,70; P > 0,05] ou água [F(4,8) = 0,46; P > 0,05] em relação ao grupo controle (veículo i.c.v. + salina NPBL) (Tabela 4).

Em animais que receberam injeções no OSF, porém fora no NPBL, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) em tecido adjacente ao NPBL combinadas com injeção de veículo no OSF não induziram ingestão de NaCl 0,3 M [F(3,6) = 0,98; P > 0,05] e água [F(3,6) = 0,51; P > 0,05] em ratos saciados e normovolêmicos. A injeção de losartan (1,0 µg/0,1 µl) e atropina (2 nmol/0,1 µl) no OSF em animais que receberam muscimol fora do NPBL também não modificou a ingestão de NaCl 0,3 M e água (Tabela 5).

Tabela 3 – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan ou veículo.

Tratamento	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
n = 4				
veículo i.c.v. + salina fora do NPBL	2,2 ± 1,8	2,4 ± 1,7	2,7 ± 1,6	2,8 ± 1,6
veículo i.c.v. + muscimol fora do NPBL	4,8 ± 2,8	5,0 ± 2,7	5,0 ± 2,7	5,0 ± 2,7
LOS (50 µg) i.c.v. + muscimol fora do NPBL	2,2 ± 1,8	2,4 ± 1,7	2,7 ± 1,6	2,8 ± 1,6
LOS (100 µg) i.c.v. + muscimol fora do NPBL	4,7 ± 3,7	4,7 ± 3,7	5,0 ± 3,6	5,1 ± 3,6
	Ingestão de água (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo i.c.v. + salina fora do NPBL	2,2 ± 1,8	2,4 ± 1,7	2,7 ± 1,6	2,8 ± 1,6
veículo i.c.v. + muscimol fora do NPBL	4,6 ± 3,1	5,4 ± 3,9	5,5 ± 4,0	5,5 ± 4,0
LOS (50 µg) i.c.v. + muscimol fora do NPBL	2,2 ± 1,8	2,4 ± 1,7	2,7 ± 1,6	2,8 ± 1,6
LOS (100 µg) i.c.v. + muscimol fora do NPBL	2,2 ± 1,8	2,4 ± 1,7	2,7 ± 1,6	2,8 ± 1,6

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), losartan (LOS, 50 e 100 µg/1,0 µl), veículo (solução salina tamponada).

Tabela 4 – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinado com injeção i.c.v. de losartan, atropina ou veículo.

Tratamento n = 3	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo i.c.v. + salina fora do NPBL	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
veículo i.c.v. + muscimol fora do NPBL	0,7 ± 0,5	0,9 ± 0,5	3,1 ± 2,3	3,1 ± 2,3
LOS i.c.v. + muscimol fora do NPBL	0,5 ± 0,4	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,4
atropina i.c.v. + muscimol fora do NPBL	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,5	2,8 ± 0,5	2,8 ± 0,5
LOS + atropina i.c.v. + muscimol fora do NPBL	1,2 ± 1,0	1,7 ± 0,9	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,8

	Ingestão de água (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo i.c.v. + salina fora do NPBL	1,2 ± 1,1	1,2 ± 1,1	1,2 ± 1,1	1,3 ± 1,1
veículo i.c.v. + muscimol fora do NPBL	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	1,2 ± 1,1	1,9 ± 1,8
LOS i.c.v. + muscimol fora do NPBL	1,1 ± 0,9	1,1 ± 0,9	1,5 ± 0,8	1,9 ± 0,9
atropina i.c.v. + muscimol fora do NPBL	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,8
LOS + atropina i.c.v. + muscimol fora do NPBL	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,5

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), losartan (LOS, 100 µg/1,0 µl), atropina (20 nmol/1,0 µl), veículo (solução salina tamponada).

Tabela 5 – Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de muscimol ou salina fora do NPBL combinado com injeção de losartan, atropina ou veículo no OSF.

Tratamento n = 3	Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo OSF + salina fora do NPBL	0,9 ± 0,8	0,9 ± 0,8	1,9 ± 1,7	1,9 ± 1,7
veículo OSF + muscimol fora do NPBL	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
losartan OSF + muscimol fora do NPBL	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,3
atropina OSF + muscimol fora do NPBL	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3
	Ingestão de água (ml)			
	60 min	120 min	180 min	240 min
veículo OSF + salina fora do NPBL	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
veículo OSF + muscimol fora do NPBL	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3
losartan OSF + muscimol fora do NPBL	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2
atropina OSF + muscimol fora do NPBL	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,9 ± 0,7	1,0 ± 0,7

Valores são representados como média ± E.P.M.; n = número de animais. Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), losartan (1 µg/0,1 µl), atropina (2 nmol/0,1 µl), veículo (solução salina tamponada).

5 DISCUSSÃO

Semelhante a estudos prévios, os presentes resultados mostram que o bloqueio de neurônios do NPBL com injeções bilaterais de muscimol nessa área induz ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados e normovolêmicos e confirmam a importância dos mecanismos colinérgicos centrais para essa resposta^{7,13}. A novidade do presente estudo é que os mecanismos angiotensinérgicos centrais facilitatórios também são essenciais para a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL. Os resultados também mostram pela primeira vez um importante papel do órgão subfornical como local de ação dos mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos para a estimulação da ingestão de NaCl 0,3 M e água quando os mecanismos inibitórios da ingestão de NaCl e água são bloqueados pela injeção de muscimol no NPBL. Os presentes resultados mostram ainda que o bloqueio isolado ou combinado dos mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos centrais produzem redução similar na ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela injeção de muscimol no NPBL, o que sugere que os mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos parecem atuar por meio da mesma via de facilitação da ingestão de NaCl e água. Finalmente, os presentes resultados também mostram que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos centrais com a injeção i.c.v. de moxonidina reduz a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pelo muscimol no NPBL. Nesse caso, porém não é possível se descartar ações inespecíficas da ativação desses receptores, já que a injeção i.c.v. de moxonidina também reduz a ingestão de sacarose 2%. Portanto, os tratamentos que reduzem a atividade de mecanismos facilitatórios prosencefálicos (bloqueio dos mecanismos angiotensinérgico e colinérgico ou ativação do mecanismo inibitório adrenérgico α_2) afetam a ingestão de NaCl e água induzida pelo muscimol no NPBL, sugerindo que a atividade dos mecanismos facilitatórios prosencefálicos, em particular do OSF, é essencial para a ingestão de NaCl e água induzida pelo muscimol injetado no NPBL.

A especificidade do NPBL como local em que as injeções de muscimol induzem ingestão de NaCl e água foi confirmada por resultados de animais que receberam injeções bilaterais de muscimol em tecidos adjacentes ao NPBL, nos quais as injeções de muscimol não induzem ingestão de NaCl e água. É importante destacar que injeções de muscimol no NPBL induzem ingestão de água e, especialmente, de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos, ou seja, em ratos que não são submetidos a nenhum tratamento que leva à ativação de mecanismos facilitatórios da ingestão de NaCl e água. Apesar disso, os presentes resultados sugerem que a atividade de mecanismos facilitatórios prosencefálicos, mais especificamente dos mecanismos facilitatórios prosencefálicos angiotensinérgico e colinérgico, particularmente do OSF, é essencial para a liberação da ingestão de água e especialmente de NaCl após o bloqueio dos mecanismos inibitórios com a injeção de muscimol no NPBL. Embora ratos saciados não tenham atividade aumentada dos mecanismos facilitatórios, talvez haja uma atividade basal residual dos mecanismos facilitatórios que é suficiente para induzir o apetite ao sódio se os mecanismos inibitórios forem desativados. Estudo ainda não publicado de nosso laboratório também mostrou que a ativação gabaérgica do NPBL não alterou a ativação neuronal na região AV3V e do OSF, já que a expressão da proteína c-fos não foi alterada nessas regiões após a injeção de muscimol no NPBL em animais que não tiveram acesso à solução de NaCl 0,3 M e água. Esses resultados corroboram com a possibilidade de que a retirada do mecanismo inibitório poderia estar levando à liberação de um mecanismo facilitador basal que associado à retirada do mecanismo inibitório, poderia ser o responsável pela ingestão de sódio. Portanto, parece que a saciedade para o sódio é fortemente dependente da atividade de mecanismos inibitórios que agem restringindo a ingestão de NaCl. Se os mecanismos inibitórios forem desativados como ocorre com injeções bilaterais de muscimol no NPBL, haverá um desequilíbrio nos mecanismos

responsáveis por manter a saciedade e a atividade basal do mecanismo facilitatório promove a ingestão de NaCl e água.

Injeções de muscimol no NPBL normalmente induzem a ingestão de quantidades significativas de água se os ratos ingerirem simultaneamente NaCl 0,3 M. No entanto, ratos tratados com muscimol no NPBL ingerem apenas uma pequena quantidade de água se apenas água estiver disponível¹³. Portanto, parece que a maior parte da água ingerida pelos ratos tratados com muscimol no NPBL é consequência do aumento na osmolalidade plasmática produzida pela ingestão excessiva de NaCl hipertônico quando NaCl 0,3 M está disponível simultaneamente. Sendo assim, o muscimol no NPBL afeta preferencialmente a ingestão de NaCl e provavelmente o mecanismo inibitório do NPBL esteja relacionado principalmente com o controle da ingestão de NaCl. Portanto, a abolição da ingestão de água após injeções i.c.v. ou no OSF de atropina e losartan possivelmente esteja relacionada com a redução na ingestão de NaCl hipertônico produzida por esses tratamentos em animais que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL.

Ratos saciados que receberam sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M combinada com bloqueio dos mecanismos serotoninérgicos ou ativação do mecanismo adrenérgico α_2 no NPBL apresentam uma ingestão paradoxal de NaCl 0,3 M^{3,22}. Como apenas o bloqueio serotoninérgico ou ativação adrenérgica α_2 no NPBL não produzem ingestão de NaCl em ratos saciados que não receberam tratamento prévio, esses resultados sugerem que a ativação de osmorreceptores também produz sinais facilitatórios para a ingestão de NaCl. A hipótese é que a ativação de osmorreceptores produz simultaneamente dois sinais opostos, um facilitatório e outro inibitório para a ingestão de NaCl e esses sinais normalmente se anulam. O sinal inibitório produzido pela ativação de osmorreceptores parece depender da atividade do NPBL. Se os mecanismos inibitórios do NPBL forem desativados, o único sinal produzido pela ativação de osmorreceptores que restaria seria o sinal facilitatório que então levaria à

ingestão de NaCl hipertônico^{3,22}. Estudos de Lee et al.⁵² sugerem que a ingestão de água induzida pelo aumento da osmolalidade plasmática, ou seja, ativação de osmorreceptores, depende da ativação de mecanismos colinérgicos centrais.

Semelhante aos protocolos que induzem o aumento na osmolalidade plasmática através da sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, a ingestão excessiva de NaCl hipertônico após o tratamento com muscimol no NPBL também poderia causar um pequeno aumento na osmolalidade plasmática e, conseqüentemente, ativação dos osmorreceptores e de mecanismos colinérgicos centrais. Da mesma forma que o tratamento com metisergida ou moxonidina no NPBL em ratos com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, a ativação dos osmorreceptores em animais que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL produz apenas sinais facilitatórios para a ingestão de NaCl, já que os neurônios do NPBL estão inibidos pela injeção de muscimol na região. Sendo assim, o efeito inicial do muscimol no NPBL seria multiplicado pela ativação dos osmorreceptores, gerando uma intensa ingestão de NaCl.

No presente estudo, o bloqueio colinérgico central ou mais especificamente no OSF reduziu a ingestão de NaCl e água induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL. Se os mecanismos colinérgicos centrais são ativados pelos osmorreceptores, talvez o bloqueio colinérgico central possa interromper os sinais provenientes dos osmorreceptores que são ativados pelo aumento da osmolaridade plasmática causada pela ingestão de NaCl hipertônico induzida por muscimol no NPBL. Assim, poderia se justificar a redução na ingestão de NaCl e água induzida por muscimol no NPBL em animais pré-tratados com atropina no VL ou OSF. Então, em adição aos sinais basais produzidos pelos receptores AT₁, sinais produzidos pela ativação dos osmorreceptores durante a ingestão de NaCl hipertônico também poderiam ser responsáveis pela ingestão de NaCl após a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL. Além disso, é provável que as injeções de atropina ou losartan no VL ou

OSF apenas causam redução e não abolição da ingestão de NaCl e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL porque outras áreas cerebrais ou outros mecanismos não afetados pelas injeções no VL ou no OSF podem gerar sinais facilitatórios para a ingestão de NaCl.

Estudos prévios demonstraram que a ANG II agindo nos receptores do OSF produz uma intensa ingestão de NaCl 0,3 M quando os mecanismos serotoninérgicos são inibidos por injeções bilaterais de metisergida no NPBL e a injeção do antagonista de receptores AT₁ losartan no OSF abole o aumento na ingestão de NaCl e água induzido pela injeção de metisergida no NPBL em ratos tratados com furosemida + captopril^{16,56}. Os resultados do presente estudo mostram que a injeção de losartan i.c.v. ou no OSF, reduzem a ingestão de NaCl e água induzida pelo muscimol no NPBL. Como injeções de losartan no III-V ou no tecido adjacente ao OSF não produzem respostas semelhantes àquela obtida com a injeção de losartan no OSF, a redução da ingestão de NaCl e água parece depender da ativação de receptores AT₁ do OSF. Sendo assim, os resultados prévios e os presentes resultados sugerem que os efeitos dipsogênico e natriorexigênico da ANG II agindo em receptores AT₁ são facilitados pelo bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL.

Sabe-se que a lesão da região AV3V reduz as respostas pressora e dipsogênica induzida por estimulações centrais colinérgica e angiotensinérgica^{11,61}. Ainda, a lesão da região AV3V abole a ingestão de NaCl e água induzida pela injeção de muscimol no NPBL²⁴. Como a lesão da região AV3V abole, enquanto a desativação dos mecanismos facilitatórios angiotensinérgico e colinérgico apenas reduz a ingestão de NaCl e água, é provável que outros mecanismos ou mesmo outras áreas livres de barreira hematoencefálica, além do OSF e seus mecanismos facilitatórios angiotensinérgico e colinérgico, estejam envolvidas na ingestão de NaCl e água pelo muscimol.

Os presentes resultados ainda mostram que o bloqueio isolado ou combinado dos mecanismos facilitatórios angiotensinérgicos e colinérgicos centrais produz redução similar na ingestão de NaCl e água induzida pela injeção de muscimol no NPBL. Embora esse resultado seja intrigante, Lee et al.⁵² também obtiveram resultados semelhantes, isto é, a injeção i.c.v. de atropina sozinha ou combinado com losartan causa redução de mesma magnitude da ingestão de água induzida por privação hídrica por 48 horas. Existem evidências farmacológicas da independência dos mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos, incluindo o fato de que o losartan abole a ingestão de água induzida por ANG II, mas não induzida por carbacol e que a atropina reduz a ingestão de água induzida por carbacol, mas não por ANG II⁶⁹. Como mesmo após o bloqueio simultâneo dos receptores angiotensinérgicos e colinérgicos não é possível abolir a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por injeção de muscimol no NPBL e essa ingestão ainda é de mesma magnitude que o bloqueio dos mecanismos angiotensinérgico e colinérgico de maneira isolada, talvez haja uma interação entre esses mecanismos. Uma possibilidade é que os mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos centrais possam ativar a mesma via neural facilitatória da ingestão de água e NaCl quer atuando nos mesmos neurônios ou em neurônios diferentes que estariam em série na mesma via. Ou seja, um mesmo neurônio poderia ser ativado tanto pela ANG II como pela acetilcolina ou então a ação de um desses neurotransmissores levaria à liberação do outro em neurônios organizados em série na mesma via.

Agonistas mistos adrenérgicos α_2 e imidazólicos como a clonidina e moxonidina são bastante conhecidos por sua ação anti-hipertensiva. Paralelamente à ação anti-hipertensiva, a injeção de clonidina e moxonidina em diferentes áreas prosencefálicas, como o VL e III-V, área septal, área pré-óptica lateral e hipotálamo lateral também inibem a ingestão de água induzida por diferentes estímulos como privação hídrica, infusão de salina hipertônica e estimulação angiotensinérgica e colinérgica central^{12,14,30,31,34-37}. Em algumas

dessas áreas, injeções de clonidina ou moxonidina também reduzem a ingestão de NaCl induzida por depleção, injeção i.c.v. de renina e injeção periférica de DOCA^{23,26,28,62,73,77,85,86}. Os efeitos antidipsogênico e antinatriorexigênico da clonidina e moxonidina parecem depender principalmente da ativação dos receptores adrenérgicos α_2 centrais e sua possível interação com receptores imidazólicos^{26,62,77,85}. Os presentes resultados mostram que injeções i.c.v. de moxonidina produzem um efeito antidipsogênico e antinatriorexigênico em animais tratados com muscimol no NPBL. Uma possível explicação para o efeito inibitório da injeção i.c.v. de moxonidina é que o mecanismo inibitório adrenérgico α_2 possa bloquear a atividade basal do mecanismo prosencefálico facilitatório angiotensinérgico ou a ativação do mecanismo prosencefálico facilitatório colinérgico. Como losartan e atropina apenas reduziram, enquanto a moxonidina aboliu a ingestão de NaCl e água, essa explicação acima mencionada pode ser responsável apenas por parte da resposta. Deve-se considerar que a injeção i.c.v. de moxonidina também causou uma redução da ingestão de sacarose 2%. O uso de agonista adrenérgicos α_2 /imidazólicos como agente anti-hipertensivo está associado com alguns efeitos adversos, incluindo a sedação¹⁷. O mecanismo responsável pelo efeito dos agonistas adrenérgicos α_2 na atividade motora parece estar envolvido com a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 pré-sinápticos que reduz a transmissão noradrenérgica por ativar uma via de retroalimentação negativa que age inibindo liberação subsequente de neurotransmissor⁷⁶, embora talvez seja possível que esse efeito adverso seja devido à ativação de receptores adrenérgicos α_2 pós-sinápticos⁷⁵. Sendo assim, a abolição da ingestão de NaCl e água pode também resultar de ação inespecífica da moxonidina injetada centralmente.

Estudos prévios mostraram que a lesão do CeA abole o aumento na ingestão de NaCl e água produzida por injeções bilaterais de moxonidina no NPBL e reduziu o aumento produzido pela injeção de metisergida no NPBL em animais tratados com furosemida + captopril⁵. Além disso, a lesão do CeA abole a ingestão de NaCl e água induzida por injeção

de muscimol no NPBL⁴. Portanto, o aumento na ingestão de NaCl e água produzida pelo bloqueio serotoninérgico ou ativação adrenérgica α_2 do NPBL e a ingestão de NaCl e água induzida pela ativação gabaérgica do NPBL parece depender da integridade do CeA, sugerindo que existem conexões entre os mecanismos inibitórios do NPBL e o CeA no controle da ingestão de NaCl. Conexões gabaérgicas entre o CeA e o NPBL foram descritas recentemente e o CeA também está conectado diretamente com neurônios HSD2 do NTS^{40,41}. Os neurônios HSD2 são ativados por mineralocorticoides e desativados pela ingestão de sódio^{40,42,45}. Sugere-se que o NPBL e o CeA são fortemente conectados para controlar o apetite ao sódio. Parece que o aumento na ingestão de NaCl produzido pela desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL é totalmente dependente de mecanismos facilitatórios integrados no CeA^{4,5}. É possível que os mecanismos inibitórios do NPBL reduzam a atividade dos neurônios do CeA, que são importantes para a ingestão de NaCl, porém com os resultados até hoje disponíveis, não se pode afirmar conclusivamente se os mecanismos inibitórios do NPBL inibem diretamente os neurônios do CeA ou inibem neurônios de outras áreas do cérebro que são ativadas por sinais do CeA. No entanto, mesmo considerando a segunda possibilidade, ainda é possível sugerir que haja uma conexão entre os sinais inibitórios do NPBL e os sinais facilitatórios da amígdala no controle da ingestão de NaCl.

O CeA poderia receber sinais facilitatórios de outras áreas como dos neurônios HSD2 do NTS que são ativados por mineralocorticoides^{40,42}. Ainda, de acordo com os presentes resultados, é possível que os neurônios do CeA também recebam sinais facilitatórios oriundos do OSF devido à ativação de receptores AT_1 ou dos osmorreceptores nessa área. Esses sinais facilitatórios poderiam chegar ao CeA através de projeções diretas do OSF para o CeA⁴⁹. Outra possibilidade é que esses sinais facilitatórios cheguem ao CeA de maneira indireta, ou seja, a ativação dos receptores AT_1 ou dos osmorreceptores no OSF causariam a ativação de outras e essas áreas, por sua vez, enviariam projeções para o CeA. A

área septal, o hipotálamo lateral, órgão vasculoso da lâmina terminal e o núcleo supra-óptico são possíveis áreas que, por receberem projeções do OSF, poderiam estar envolvidas na via de conexão indireta entre OSF e CeA. Contudo, independente de ser por projeção direta ou indireta, o CeA receberia e integraria sinais facilitatórios e inibitórios da ingestão de NaCl que definiriam o aparecimento ou não do comportamento.

A Figura 8 mostra um modelo esquemático de possíveis mecanismos e conexões entre áreas centrais envolvidas no controle da ingestão de NaCl e água. Os sinais inibitórios para a ingestão de NaCl e água, tais como a ativação de receptores cardiopulmonares, barorreceptores, receptores gustativos e sinais humorais, chegariam à AP/NTS e então ativariam o NPBL. Os neurotransmissores envolvidos na ativação do mecanismo inibitório do NPBL são a colecistocinina, serotonina e glutamato. O NPBL, por sua vez, emite projeção inibitório para o CeA. Em contrapartida a esse sinal inibitório que chega ao CeA proveniente do NPBL, sinais facilitatórios também chegam ao CeA. Além dos sinais originados no NTS pela ação dos mineralocorticóides, esses sinais facilitatórios poderiam ser sinais provenientes do OSF que é ativado pela ação da ANG II nos receptores AT₁ ou pelo aumento da atividade dos osmorreceptores decorrente do aumento na osmolalidade plasmática, ativando vias colinérgicas centrais. De acordo com os presentes resultados, a ativação dos mecanismos angiotensinérgico ou colinérgico podem ativar vias paralelas, mas que culminam na ativação da mesma via neural de facilitação ou então os mecanismos angiotensinérgico e colinérgico podem estar em série numa mesma via. Portanto, a ingestão de sódio parece depender da ativação do CeA que recebe sinais inibitórios e facilitatórios. Sendo assim, a saciedade ou o apetite ao sódio provavelmente é o resultado da ação de sinais opostos que chegam ao CeA. Se os sinais inibitórios forem predominantes, o resultado é a saciedade; no entanto, se os sinais predominantes forem facilitatórios, o resultado é o apetite ao sódio.

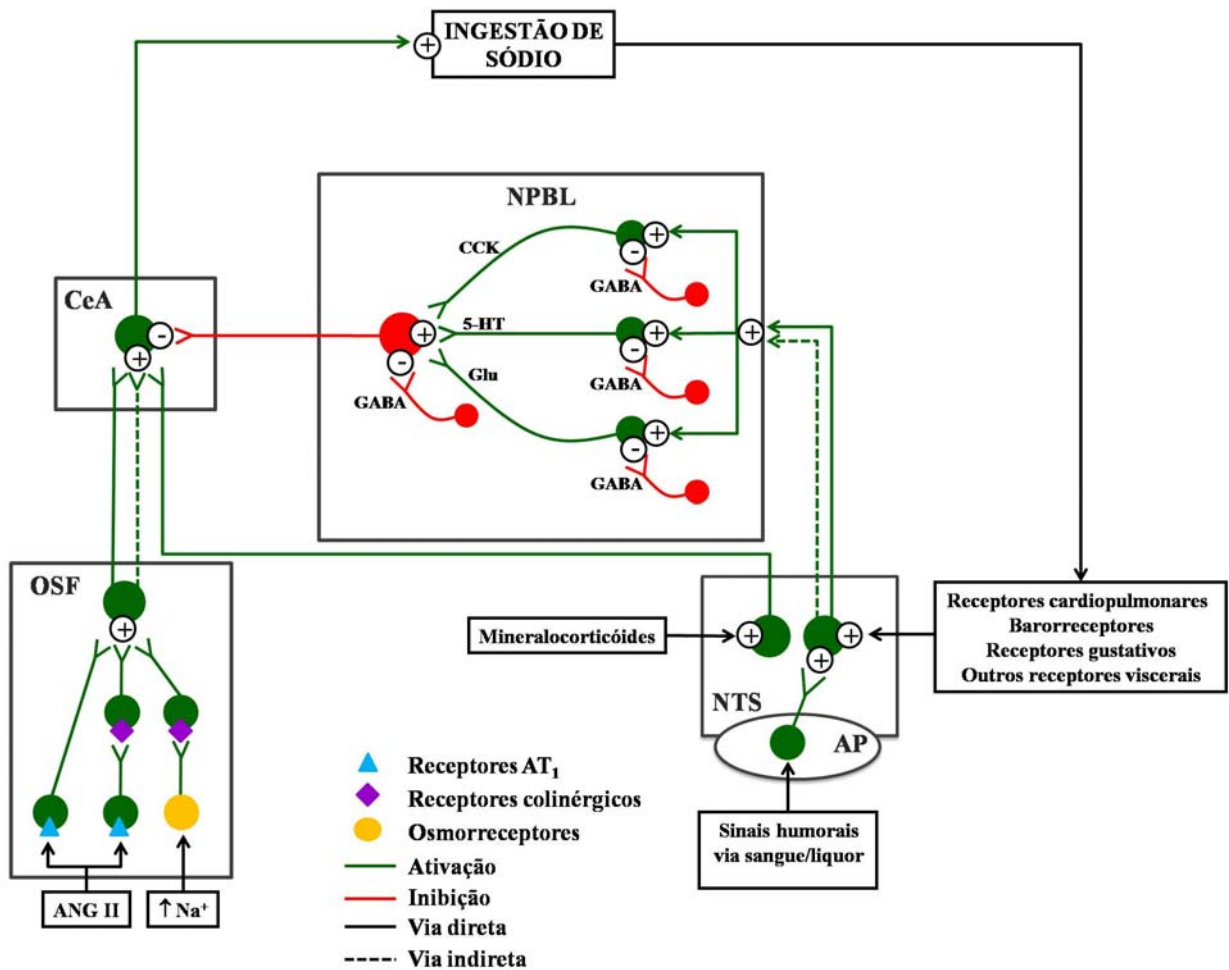


FIGURA 8 – Diagrama esquemático mostrando possíveis mecanismos facilitatórios e inibitórios e áreas encefálicas envolvidas no controle da sede e apetite ao sódio. +, excitação; -, inibição; 5-HT, serotonina; ANG II, angiotensina II; AP, área postrema; CCK, colecistocinina; CeA, núcleo central da amígdala; Glu, glutamato; NPBL, núcleo parabraquial lateral; NTS, núcleo do trato solitário; OSF, órgão subfornical.

Em resumo, os presentes resultados mostram que o bloqueio dos mecanismos facilitatórios angiotensinérgicos centrais reduz a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por injeções bilaterais de muscimol no NPBL. O bloqueio isolado ou combinado dos mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos centrais produz redução similar na ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela injeção de muscimol no NPBL. O OSF é o local de ação dos mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos para a estimulação da ingestão de NaCl 0,3 M e água quando os mecanismos inibitórios da ingestão de água e sódio são bloqueados pela injeção de muscimol no NPBL. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos reduz a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pelo muscimol no NPBL, embora esse efeito possa ser por ações inespecíficas da ativação desses receptores.

6 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que os tratamentos que reduzem a atividade de mecanismos facilitatórios proencefálicos (bloqueio dos mecanismos angiotensinérgico e colinérgico ou ativação do mecanismo inibitório adrenérgico α_2 /imidazólico) afetam a ingestão de NaCl e água induzida pelo muscimol no NPBL, sugerindo que a atividade dos mecanismos facilitatórios proencefálicos é essencial para a ingestão de NaCl e água produzida pela desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL com injeções de muscimol nessa área em ratos saciados e normovolêmicos.

7 REFERÊNCIAS*

- 1 Andersson B. Regulation of water intake. *Physiol Rev.* 1978; 58: 582.
- 2 Andrade CAF, Barbosa SP, De Luca Jr. LA, Menani JV. Activation of α_2 -adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. *Neuroscience.* 2004; 129: 25-34.
- 3 Andrade CAF, De Luca Jr. LA, Colombari DSA, Menani JV. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. *Neuroscience.* 2006; 142: 21-8.
- 4 Andrade-Franzé GMF, Andrade CAF, De Luca Jr. LA, de Paula PM, Colombari DSA, Menani JV. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. *Brain Res.* 2010; 1332: 57-64.
- 5 Andrade-Franzé GMF, Andrade CAF, De Luca Jr. LA, de Paula PM, Menani JV. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. *Neuroscience.* 2010; 165: 633-41.
- 6 Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Samson WK. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits saline preference in the rat. *Endocrinology.* 1986; 118: 1726-8.
- 7 Asnar DS, Roncari CF, De Luca Jr. LA, de Paula PM, Menani JV. Participação de receptores colinérgicos centrais na ingestão de água e sódio induzida pela ativação gabaérgica do núcleo parabraquial lateral. In: 24. Reunião Anual da FeSBE; 2009; Águas de Lindóia (SP). Águas de Lindóia: FeSBE; 2009. p. 588
- 8 Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am J Physiol.* 1995; 269: R245-R251.
- 9 Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ.* 2002; 26: 8-20.
- 10 Brody MJ, Fink GD, Buggy T, Haywood JR, Gordon FJ, Johnson AK. The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. *Circ Res.* 1978; 43: 1-13.
- 11 Brody MJ, Johnson AK. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. In: Martini L, Ganong WF, editors. *Frontiers in neuroendocrinology.* New York: Raven Press; 1980. p. 249-92.
- 12 Callera JC, Camargo LA, De Luca Jr. LA, Menani JV, Renzi A, Saad WA. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral preoptic area reduce water intake in dehydrated rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 46: 39-43.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

-
- 13 Callera JC, de Oliveira LB, Barbosa SP, Colombari DSA, De Luca Jr. LA, Menani JV. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. *Neuroscience*. 2005; 134: 725-35.
 - 14 Callera JC, Saad WA, Camargo LA, Renzi A, De Luca Jr. LA, Menani JV. Role of the adrenergic pathways of the lateral hypothalamus on water intake and pressor response induced by the cholinergic activation of the medial septal area in rats. *Neurosci Lett*. 1994; 167: 153-5.
 - 15 Ciriello J, Lawrence D, Pittman QJ. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. *Brain Res*. 1984; 322: 388-92.
 - 16 Colombari DS, Menani JV, Johnson AK. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am J Physiol*. 1996; 271: R1470-R1476.
 - 17 Davidov M, Kakaviatos N, Finnerty FA, Jr. The antihypertensive effects of an imidazoline compound. *Clin Pharmacol Ther*. 1967; 8: 810-6.
 - 18 De Castro e Silva E, Fregoneze JB, Johnson AK. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290: R1136-R1141.
 - 19 De Gobbi JIF, Barbosa SP, De Luca Jr. LA, Thunhorst RL, Johnson AK, Menani JV. Activation of serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. *Brain Res*. 2005; 1066: 1-9.
 - 20 De Gobbi JIF, De Luca Jr. LA, Johnson AK, Menani JV. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 280: R1301-R1307.
 - 21 De Gobbi JIF, De Luca Jr. LA, Menani JV. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. *Brain Res*. 2000; 880: 131-8.
 - 22 De Luca Jr. LA, Barbosa SP, Menani JV. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. *Neuroscience*. 2003; 121: 1055-61.
 - 23 De Luca Jr. LA, Menani JV. Multifactorial control of water and saline intake: role of α_2 -adrenoceptors. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30: 497-502.
 - 24 de Oliveira LB, Callera JC, Colombari DSA, De Luca Jr. LA, Menani JV. AV3V lesions reduces sodium and water intake produced by GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus. In: 20^a Reunião Anual da FeSBE; 2005; Águas de Lindóia (SP). Águas de Lindóia: FeSBE; 2005.
 - 25 de Oliveira LB, Callera JC, De Luca Jr. LA, Colombari DSA, Menani JV. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain Res Bull*. 2007; 73: 238-47.
-

-
- 26 de Oliveira LB, De Luca Jr. LA, Menani JV. Moxonidine and central α_2 adrenergic receptors in sodium intake. *Brain Res.* 2003; 993: 177-82.
 - 27 de Oliveira LB, De Luca Jr. LA, Menani JV. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. *Neuroscience.* 2008; 155: 350-8.
 - 28 de Paula PM, Sato MA, Menani JV, De Luca Jr. LA. Effects of central α -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. *Neurosci Lett.* 1996; 214: 155-8.
 - 29 Edwards GL, Johnson AK. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am J Physiol.* 1991; 261: R1039-R1044.
 - 30 Ferrari AC, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, De Luca Jr. LA, Menani JV. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. *Brain Res.* 1990; 522: 125-30.
 - 31 Ferrari AC, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, De Luca Jr. LA, Menani JV. Role of the α_1 - and α_2 -adrenoceptors of the lateral hypothalamus in the dipsogenic response to central angiotensin II in rats. *Brain Res.* 1991; 560: 291-6.
 - 32 Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 1998; 78: 583-686.
 - 33 Franci CR. Possible dual effect of endogenous ANP on water and sodium intake and role of AII. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997; 21: 525-9.
 - 34 Fregly MJ, Kelleher DL. Antidipsogenic effect of clonidine on isoproterenol induced water intake. *Appetite.* 1980; 1: 279-89.
 - 35 Fregly MJ, Kelleher DL, Greenleaf JE. Antidipsogenic effect of clonidine on angiotensin II-, hypertonic saline-, pilocarpine- and dehydration-induced water intakes. *Brain Res Bull.* 1981; 7: 661-4.
 - 36 Fregly MJ, Rowland NE, Greenleaf JE. A role for presynaptic α_2 -adrenoceptors in angiotensin II-induced drinking in rats. *Brain Res Bull.* 1984; 12: 393-8.
 - 37 Fregly MJ, Rowland NE, Greenleaf JE. Clonidine antagonism of angiotensin-related drinking: a central site of action. *Brain Res.* 1984; 298: 321-7.
 - 38 Fulwiler CE, Saper CB. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.* 1984; 319: 229-59.
 - 39 Galaverna O, De Luca Jr. LA, Schulkin J, Yao SZ, Epstein AN. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res Bull.* 1992; 28: 89-98.
 - 40 Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol.* 2006; 497: 646-57.
-

-
- 41 Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: efferent projections. *J Comp Neurol.* 2006; 497: 223-50.
 - 42 Geerling JC, Loewy AD. Sodium deprivation and salt intake activate separate neuronal subpopulations in the nucleus of the solitary tract and the parabrachial complex. *J Comp Neurol.* 2007; 504: 379-403.
 - 43 Herbert H, Moga MM, Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1990; 293: 540-80.
 - 44 Jhamandas JH, Petrov T, Harris KH, Vu T, Krukoff TL. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: electrophysiological and anatomical observations. *Brain Res Bull.* 1996; 39: 115-26.
 - 45 Jia HG, Zhang GY, Wan Q. A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus: an ultrastructural study of anterograde tracing in combination with post-embedding immunocytochemistry in the rat. *Neurosci Lett.* 2005; 382: 153-7.
 - 46 Johnson AK. The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Res Bull.* 1985; 15: 595-601.
 - 47 Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996; 23: 183-91.
 - 48 Johnson AK, Edwards GL. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. *Current topics in neuroendocrinology.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1990. p. 149-90.
 - 49 Johnson AK, Gross PM. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.* 1993; 7: 678-86.
 - 50 Johnson AK, Loewy AD. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In: Loewy AD, Spyer KM, editors. *Central regulation of autonomic function.* New York: Oxford University Press; 1990. p. 247-67.
 - 51 Krukoff TL, Harris KH, Jhamandas JH. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Brain Res Bull.* 1993; 30: 163-72.
 - 52 Lee WJ, Kim KS, Yang EK, Lee JH, Lee EJ, Park JS, Kim HJ. Effect of brain angiotensin II AT1, AT2, and cholinergic receptor antagonism on drinking in water-deprived rats. *Regul Pept.* 1996; 66: 41-6.
 - 53 Mangiapane ML, Simpson JB. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am J Physiol.* 1980; 239: R382-R389.
-

-
- 54 McCann SM, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36: 165-81.
 - 55 McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 1-6.
 - 56 Menani JV, Colombari DSA, Beltz TG, Thunhorst RL, Johnson AK. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Res.* 1998; 801: 29-35.
 - 57 Menani JV, De Luca Jr. LA, Thunhorst RL, Johnson AK. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279: R126-R131.
 - 58 Menani JV, De Luca Jr. LA, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol.* 1998; 274: R555-R560.
 - 59 Menani JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol.* 1995; 269: R1044-R1049.
 - 60 Menani JV, Johnson AK. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. *Am J Physiol.* 1998; 275: R1431-R1437.
 - 61 Menani JV, Saad WA, Camargo LA, Renzi A, De Luca Jr. LA, Colombari E. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosci Lett.* 1990; 113: 339-44.
 - 62 Menani JV, Sato MA, Haikel L, Vieira AA, Andrade CAF, da Silva DC, Renzi A, De Luca Jr. LA. Central moxonidine on water and NaCl intake. *Brain Res Bull.* 1999; 49: 273-9.
 - 63 Menani JV, Thunhorst RL, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am J Physiol.* 1996; 270: R162-R168.
 - 64 Moe KE, Weiss ML, Epstein AN. Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation. *Am J Physiol.* 1984; 247: R356-R365.
 - 65 Ohman LE, Johnson AK. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *Am J Physiol.* 1986; 251: R504-R509.
 - 66 Ohman LE, Johnson AK. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. *Am J Physiol.* 1989; 256: R264-R269.
 - 67 Ohman LE, Johnson AK. Role of lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch. *Brain Res.* 1995; 695: 275-8.
 - 68 Pastuskovas C, Vivas L. Effect of intravenous captopril on c-fos expression induced by sodium depletion in neurons of the lamina terminalis. *Brain Res Bull.* 1997; 44: 233-6.
-

-
- 69 Rowland NE, Fregly MJ. Brain angiotensin AT-2 receptor antagonism and water intake. *Brain Res Bull.* 1993; 32: 391-4.
 - 70 Sakai RR, Ma LY, Zhang DM, McEwen BS, Fluharty SJ. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. *Neuroendocrinology.* 1996; 64: 425-9.
 - 71 Sato MA, Sugawara AM, Menani JV, De Luca Jr. LA. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. *Regul Pept.* 1997; 69: 137-42.
 - 72 Sato MA, Yada MM, De Luca Jr. LA. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. *Physiol Behav.* 1996; 60: 1099-104.
 - 73 Sato MA, Yada MM, Renzi A, Camargo LA, Saad WA, Menani JV, De Luca Jr. LA. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29: 1663-6.
 - 74 Simpson JB, Routtenberg A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science.* 1973; 181: 1172-5.
 - 75 Spyraiki C, Fibiger HC. Clonidine-induced sedation in rats: evidence for mediation by postsynaptic α_2 -adrenoreceptors. *J Neural Transm.* 1982; 54: 153-63.
 - 76 Strombom U, Svensson TH. Clonidine: attenuation of sedative action by facilitated central noradrenergic neurotransmission. *J Neural Transm.* 1980; 47: 29-39.
 - 77 Sugawara AM, Miguel TT, de Oliveira LB, Menani JV, De Luca Jr. LA. Noradrenaline and mixed α_2 -adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. *Brain Res.* 1999; 839: 227-34.
 - 78 Thunhorst RL, Johnson AK. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. *Am J Physiol.* 1994; 266: R458-R465.
 - 79 Verbalis JG, Blackburn RE, Hoffman GE, Stricker EM. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 395: 209-25.
 - 80 Vivas L, Chiaraviglio E, Carrer HF. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. *Brain Res.* 1990; 519: 294-300.
 - 81 Vivas L, Pastuskovas CV, Tonelli L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Brain Res.* 1995; 679: 34-41.
 - 82 Weisinger RS, Blair-West JR, Burns P, Denton DA, McKinley MJ, Tarjan E. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: a brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. *Regul Pept.* 1996; 66: 73-81.
-

-
- 83 Weisinger RS, Denton DA, Di Nicolantonio R, McKinley MJ, Muller AF, Tarjan E. Role of angiotensin in sodium appetite of sodium-deplete sheep. *Am J Physiol.* 1987; 253: R482-R488.
 - 84 Xu J, Woodworth CH, Johnson AK. Glutamate and the role of the lateral parabrachial nucleus in the control of water and salt intake in rats. In: *Society for Neuroscience; 1997; New Orleans (LA). New Orleans: Society for Neuroscience; 1997.*
 - 85 Yada MM, de Paula PM, Menani JV, De Luca Jr. LA. Central α -adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 57: 137-43.
 - 86 Yada MM, de Paula PM, Menani JV, Renzi A, Camargo LA, Saad WA, De Luca Jr. LA. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. *Brain Res Bull.* 1997; 42: 205-9.
-

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 29 de junho de 2010.

CAMILA FERREIRA RONCARI